

THESIS / THÈSE

MASTER IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY

Caracterisation d'un locus genomique de 25 kpb chez *Brucella melitensis* 16M potentiellement implique dans la biosynthese de polysaccharides

Vanzenbergh, Frederic

Award date:
2003

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

I. INTRODUCTION.....	3
I.1. LA BRUCELLOSE.....	3
I.1.1 HISTORIQUE.....	3
I.1.2 LA BRUCELLOSE, UNE ZOONOSE.....	3
I.1.3 PATHOGENIE DE <i>BRUCELLA</i>	3
I.1.4 <i>BRUCELLA</i> SP, L'ORGANISME RESPONSABLE DE LA BRUCELLOSE	4
I.2. <i>BRUCELLA</i> ET LES CELLULES EUCARYOTES.	5
I.2.1 SURVIE INTRACELLULAIRE DE <i>BRUCELLA</i>	5
I.2.1.1 <i>Invasion et internalisation</i>	5
I.2.1.2 <i>Trafic intracellulaire en cellules phagocytaires professionnelles et non professionnelles</i>	6
I.3. FACTEURS DE VIRULENCE.....	7
I.3.1 LIPOPOLYSACCHARIDE OU LPS.....	7
I.3.2 SYSTEME DE REGULATION A DEUX COMPOSANTES BVR/R/BVS.....	9
I.3.3 LE SYSTEME DE SECRETION DE TYPE IV, <i>VIRB</i>	9
I.3.4 CYCLIC β -1,2-GLUCANS.....	9
I.4. LE GENRE <i>BRUCELLA</i>.	10
I.4.1 POLYMORPHISME DE SEQUENCES D'INSERTION.....	11
I.4.2 POLYMORPHISME DE SEQUENCES D'ADN CONNUES.....	11
I.5. UN LOCUS DE 25 KPB EST ABSENT CHEZ <i>B. ABORTUS</i>.....	12
I.5.1 HOMOLOGUES DES ORFS DE CE LOCUS GENOMIQUE.....	12
II. BUT ET STRATEGIES DU MEMOIRE.....	15
III. RESULTATS.....	17
III.1. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES ORFS <i>IN VITRO</i>.....	17
III.1.1 EXTRACTION DE L'ARN BACTERIEN.....	17
III.1.2 MISE AU POINT DES RT-PCR.....	18
III.1.2.1 <i>Quantité d'ARN bactérien à engager</i>	18
III.1.2.2 <i>Complexité des oligonucléotides lors de la RT</i>	20
III.1.2.3 <i>RT-PCR</i>	22
III.2. ANALYSE INDIRECTE DE L'EXPRESSION DES ORFS D'INTERET <i>EX VIVO</i>.	24
III.2.1. MUTAGENÈSE PAR INTEGRATION DISRUPTIVE.....	24
III.2.1.1 <i>Construction des plasmides de disruption</i>	24
III.2.1.2 <i>Obtention des mutants des différentes ORFs chez B. melitensis 16 M</i>	28
III.2.1.3 <i>Infections des mutants en macrophage ovins</i>	32
IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	34
IV.1 ANALYSE DES ORFS EN MILIEU RICHE.....	34
IV.2 ANALYSE DES MUTANTS EN INFECTION CELLULAIRE.....	35
V. MATERIEL ET METHODES.....	36
V.1. SOUCHES BACTERIENNES ET PLASMIDES.....	36
V.1.1. E. COLI S17-1 Δ PIR.....	36
V.1.2. E. COLI DH10B.....	36
V.1.3. B. MELITENSIS 16M (NAL ^R).....	36
V.1.4. PSKORITKAN (<i>FIG. V.1</i>).....	36
V.2. MILIEUX DE CULTURE.....	36
V.2.1. MILIEU DE LURIA BERTANI (LB).....	36

Table des matières

V.2.2. MILIEU 2YT.....	37
V.2.3. ANTIBIOTIQUES.....	37
V.3. MÉTHODES RELATIVES À L'ADN.....	37
V.3.1. ELECTROPHORÈSE SUR GEL D'AGAROSE	37
V.3.2. CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES.....	39
V.3.3. TRANSFORMATION BACTÉRIENNE.....	40
V.3.4. MINIPRÉPARATION D'ADN PLASMIDIQUE.	40
V.3.5. RESTRICTION D'ADN.....	41
V.3.6. AMPLIFICATION PCR.....	41
V.3.7. CONJUGAISON BACTÉRIENNE.	42
V.3.8. EXTRACTION D'ADN GÉNOMIQUE DE <i>BRUCELLA</i> SP.....	43
V.3.9. SOUTHERN BLOTTING.	43
V.3.9.1. Restriction de l'ADN génomique.	44
V.3.9.2. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	44
V.3.9.3. Transfert et immobilisation.....	44
V.3.9.4. Préhybridation.....	45
V.3.9.5. Marquage de la sonde et hybridation.	45
V.3.9.6. Détection et révélation.	45
V.4. MÉTHODES RELATIVES À L'ARN	45
V.4.1. PRÉPARATION D'ARN.....	46
V.4.1.1. Culture de <i>B. melitensis</i> 16M.....	46
V.4.1.2. Lavage et lyse.	46
V.4.1.3. Extraction d'ARN.....	46
V.4.1.4. Evaluation de la qualité des échantillons d'ARN bactérien.	47
V.4.1.5. Elimination de l'ADN génomique, traitement à la Dnase.....	47
V.4.2. RT-PCR SUR ARN TRAITÉ À LA DNASE	48
V.4.2.1. Reverse transcription (RT).....	48
V.4.2.2. Amplification de l'ARN rétrotranscrit	49
V.5. INFECTION EN MACROPHAGE OVINS.....	49

I. Introduction.

I.1. La brucellose.

I.1.1 Historique (Denoël, 1997).

Au milieu du 19^{ème} siècle, une maladie a fait des ravages auprès de militaires établis dans les environs de Malte (ainsi que dans la population locale). Cette maladie est caractérisée par une fièvre ondulante appelée fièvre de Malte ou méditerranéenne. En 1887, le chirurgien David Bruce a isolé l'agent infectieux de la rate d'un patient décédé. Il lui attribua le nom de *Micrococcus melitensis*.

Au même moment, des danois Bang et Stribolt ont mis en évidence dans du lait de vache une bactérie responsable d'avortements chez les bovidés. Elle reçut le nom de *Bacillus abortus*.

En 1918, Alice Evans a indiqué que tant au point de vue morphologique que biochimique *M. melitensis* et *B. abortus* ne sont pas distinguables. Dès lors, il a été proposé de rassembler les 2 espèces sous le nom générique de *Brucella* donnant lieu à *B. melitensis* et *B. abortus*.

I.1.2 La brucellose, une zoonose (Denoël, 1997).

La caractéristique principale de la brucellose animale est l'infection de l'appareil génital. L'infection de femelles gestantes peut mener à l'avortement voir à la naissance prématurée du fœtus. Chez le mâle, l'infection cause principalement des lésions aux niveau des glandes génitales (orchite, épididymite). La brucellose humaine, quant à elle, est caractérisée par une fièvre ondulante provoquée par des décharges bactériémiques dans les voies sanguines. A l'inverse de la brucellose animale, la brucellose humaine est polymorphe et peut conduire à de l'arthrite, à des endocardites,...

I.1.3 Pathogénie de *Brucella* (Michaux-Charachon et al., 2002b).

Les voies de transmissions de la brucellose sont nombreuses. Les principales sources de contaminations aussi bien pour les animaux que pour les humains sont tout simplement le contact direct avec un animal infecté, des tissus d'avorton ou bien du lait infecté. Les premières étapes de l'établissement de l'infection restent un terrain mal connu. Mais comme dans de nombreuses maladies, l'infection est liée à des facteurs comme la dose infectante, l'état (de santé, âge, sexe, ...) de l'hôte potentiel et des facteurs liés à l'environnement lui-même. Les brucellae pénètrent dans leur hôte principalement via les muqueuses considérées comme la première ligne de défense de l'hôte. Le passage à travers la barrière mucoale provoque une réaction inflammatoire aiguë caractérisée par une infiltration de neutrophiles et monocytes. Dans la majorité des cas, les macrophages sont capables d'éliminer *Brucella*. Cependant une minorité de bactéries peuvent résister aux attaques bactéricides des macrophages et se multiplier dans ces cellules. Sous formes libres ou phagocytées, les bactéries se disséminent alors dans le corps. *Brucella* possède un tropisme pour les organes liés au système reproducteur mais se retrouve également dans les tissus lymphoïdes, articulations,... Pour les femelles en période de gestation, les bactéries sont principalement localisées dans les cellules trophoblastiques du placenta et au niveau des glandes mammaires.

Le pouvoir pathogène de *Brucella* pour l'homme et l'animal diffère mais la clé reste sa capacité à survivre et à se multiplier dans les macrophages et cellules phagocytaires.

I.1.4 *Brucella* sp, l'organisme responsable de la brucellose (Denoël, 1997; Walque, 1999).

Brucella est un petit cocco-bacille Gram négatif (isolé) de 0,5 µm à 1,5 µm. Ces bactéries sont des pathogènes intracellulaires facultatifs. Elles sont décrites comme ne possédant pas de flagelle, de capsule ou de forme de résistance. Des gènes homologues à des gènes flagellaires ont cependant été identifiés chez *B. abortus* (Halling, 1998) et *B. melitensis* (Fretin, 2003). Ces gènes sont en cours de caractérisation dans notre laboratoire.

Le genre *Brucella* est composé de 6 espèces, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* et *B. neotomae*. Cette classification repose sur la spécificité d'hôtes de chaque espèce (Tableau I.1). Les souches pathogènes pour l'homme sont *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* et parfois *B. canis*. Récemment, de nouvelles espèces de *Brucella* ont été découvertes chez des mammifères marins et ont été appelées *B. pinnipediae* et *B. cetaceae* mais ne constituent pas encore à ce jour des espèces officielles de *Brucella*.

ESPECES DE <i>BRUCELLA</i>	HOTES PREFERENTIELS
<i>B. melitensis</i>	Ovins, caprins
<i>B. abortus</i>	Bovins
<i>B. suis</i>	Porsins
<i>B. ovis</i>	Ovins
<i>B. canis</i>	Chien
<i>B. neotomae</i>	Rongeur

Tableau I.1 Tableau récapitulatif de la spécificité d'hôte pour chaque espèce de *Brucella*.

Le genre *Brucella* fait partie du sous-groupe α -2 des protéobactériacae (Fig.I.1). Dans ce groupe de protéobactéries, on trouve notamment des micro-organismes vivant en association avec des cellules eucaryotes animales (tels que *Brucella*, *Ochrobactrum*) ou de plantes (*Rhizobium*, *Agrobacterium*) (Moreno et al., 1990; Yanagi and Yamasato, 1993).

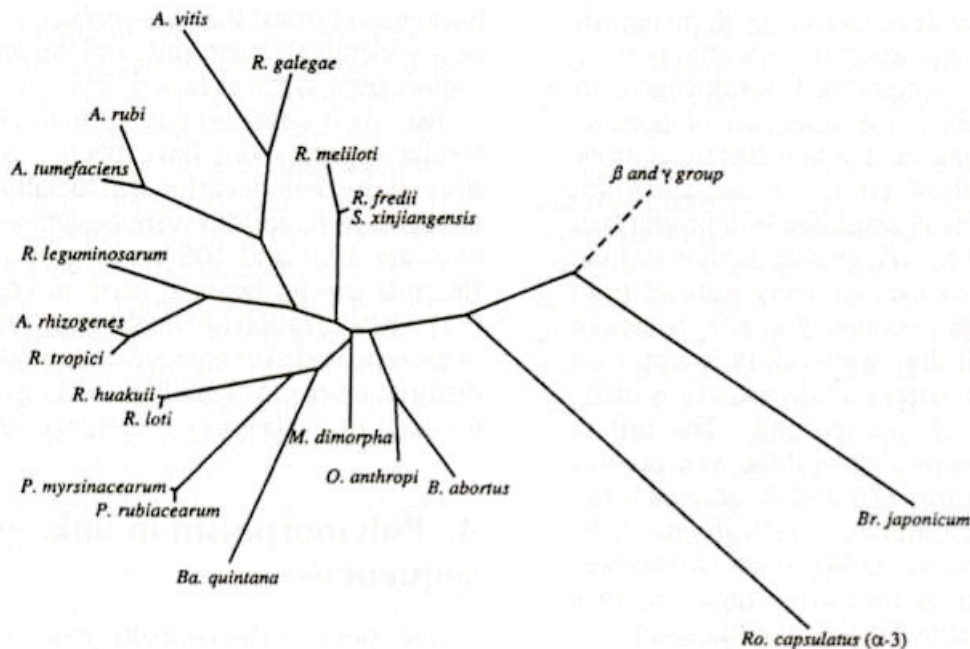


Figure I.1a Arbre phylogénétique de plusieurs membres des α -2 des protéobactériacae en accord avec la séquence nucléotidique de l'ARNr 16S. Les abréviations des genres sont comme suit : A., *Agrobacterium* ; B., *Brucella* ; Ba., *Bartonella* ; Br., *Bradhyrhizobium* ; M., *Mycoplasma* ; O., *Ochrobactrum* ; P., *Phyllobacterium* ; R., *Rhizobium* ; Ro., *Rhodobacter* ; S., *Sinorhizobium*. Reproduit de (Yanagi and Yamasato, 1993).

I.2. *Brucella* et les cellules eucaryotes.

Les *brucellae* sont des micro-organismes dont le «but ultime» est de se propager dans leur niche préférée, la cellule eucaryote (Gorvel and Moreno, 2002).

I.2.1 Survie intracellulaire de *Brucella*.

I.2.1.1 Invasion et internalisation (Michaux-Charachon et al., 2002b).

Les mécanismes d'adhérences ainsi que les récepteurs et ligands intervenant dans l'internalisation de *Brucella* sont encore peu connus.

Dans le monde bactérien, il existe 2 mécanismes principaux d'internalisation des bactéries dans les cellules eucaryotes :

- Un mécanisme de type «zipper» qui nécessite un contact direct entre les ligands bactériens et les récepteurs cellulaires provoquant un réarrangement du cytosquelette et la formation d'expansions membranaires accolées à la bactérie (Fig.I.2).
- Un mécanisme appelé «trigger» qui implique l'injection de molécules effectrices de la bactérie à l'intérieur de la cellule provoquant un réarrangement du cytosquelette et la formation d'expansions membranaires désordonnées qui conduisent à l'internalisation de la bactérie (Fig.I.2).

Récemment, Rittig a montré au moyen de la microscopie électronique que *Brucella* est internalisée par un mécanisme de type «trigger» par les cellules phagocytaires professionnelles et non professionnelles (Rittig et al., 2001).

Il a récemment été montré que l'internalisation est influencée par la chaîne O du lipopolysaccharide (M.Fernandez-Prada, 2003; Porte et al., 2003), le système de régulation à 2 composantes BvrR/BvrS (Sola-Landa, 1998) et le système de sécrétion de type IV (Kim, 2003; Kim et al., 2002).



Figure I.2a Modèles de phagocytose par un mécanisme de type «trigger» (à gauche de l'image) ou «zipper» (à droite de l'image. Reproduit de (Finlay and Cossart, 1997).

I.2.1.2 Trafic intracellulaire en cellules phagocytaires professionnelles et non professionnelles (Michaux-Charachon et al., 2002a).

Après l'internalisation dans les cellules HeLa, cellules phagocytaires non professionnelles, *Brucella* s'écarte de la voie endosomale classique. Elle inhibe la fusion avec le lysosome pour se diriger de manière transitoire dans un compartiment cellulaire présentant les marqueurs membranaires d'un autophagosome. Elle se localise ensuite dans un compartiment de multiplication exprimant des marqueurs du réticulum endoplasmique (Kim, 2003; Pizarro-Cerda et al., 1998).

Dans le macrophage, cellules phagocytaires professionnelles, *Brucella* est localisée soit dans un phagosome de type spacieux, compartiment aboutissant à la fusion avec le lysosome et à la lyse de la bactérie, soit dans un phagosome étroit permettant la survie de la bactérie. Dans les phagosomes étroits, la modification du processus de maturation est caractérisée par une acidification précoce, toutefois son trajet et le type exact du compartiment final de multiplication dans ces cellules sont mal connus (Fig.I.3).

Les facteurs bactériens actuellement identifiés comme étant impliqués dans le trafic intracellulaire de *Brucella* sont la chaîne O du LPS, le système de régulation à deux composantes BvrR/BvrS (Kim, 2003; Pizzaro-Cerda, 1998), le système de sécrétion de type IV (Comerci et al., 2001; Delrue et al., 2001) et le cyclic β -glucan (Briones et al., 2001).

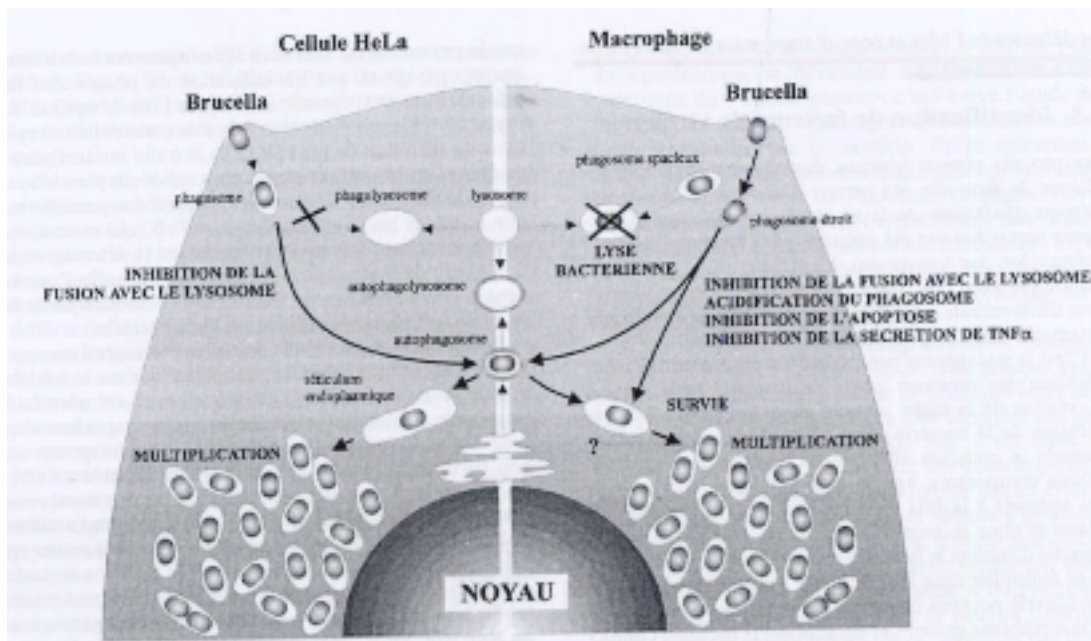


Figure I.3a Représentation schématique du trafic intracellulaire dans la cellule HeLa (côté gauche de la figure) et dans le macrophage (côté droit de la figure). Reproduit de [Michaux-Charachon, 2002 #10]

I.3. Facteurs de virulence

Les facteurs de virulence que nous discuterons ci-dessous interviennent dans l'invasion cellulaire ou à différentes étapes du trafic intracellulaire décrit ci-dessus.

I.3.1 Lipopolysaccharide ou LPS.

Le LPS est une structure présente au niveau de la couche externe de toutes les bactéries à Gram négatif, dont fait partie *Brucella*. Cette molécule est formée de 3 parties, le lipide A, le core et la chaîne O (O-PS) (Fig.I.4). Le lipide A est la partie hydrophobe de la molécule et est enchassée dans le feuillet externe de la membrane externe, l'autre pôle constitué de la chaîne O est hydrophile et reste en surface.

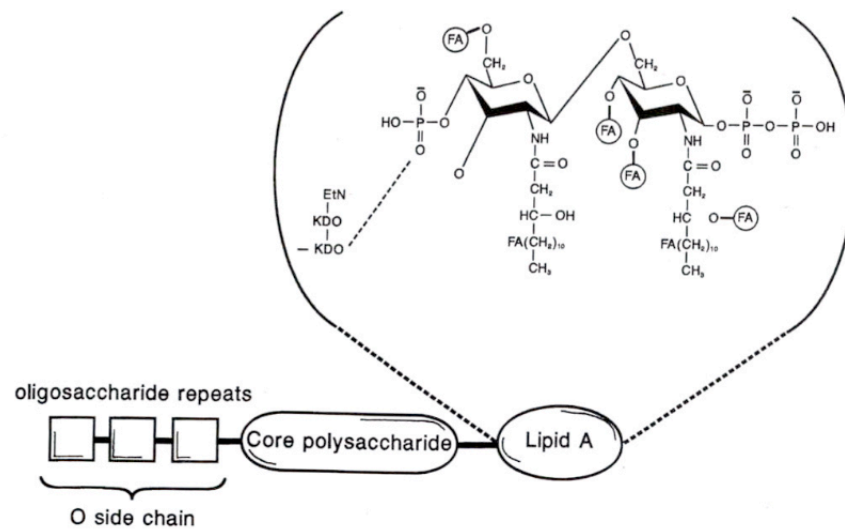


Figure I.4a Représentation schématique du LPS et des différentes parties qui le composent. Reproduit (Springer, 2000).

Le défaut structural le plus significatif rendant *Brucella* avirulente est l'absence d'O-PS. En effet, les bactéries dites lisses c'est-à-dire possédant un O-PS sont plus résistantes contre l'action des phagocytes professionnels et de leurs substances bactéricides que les souches rugueuses ne possédant pas d'O-PS (Tableau I.2).

Les bactéries rugueuses sont plus internalisées que les bactéries lisses. Ce qui suggère que la présence d'O-PS à la surface qui pourrait cacher des molécules ciblées par les récepteurs des cellules phagocytaires (M.Fernandez-Prada, 2003).

L'O-PS peut également favoriser la survie intracellulaire de *B. melitensis* en prévenant la mort cellulaire. En effet, lorsque des monocytes cultivés dans du sérum sont privés de ce même sérum, il y a induction d'un phénomène d'apoptose. Si ces monocytes ont internalisés des brucellae lisses, l'absence de sérum n'induit plus l'apoptose ce qui n'est pas le cas avec des souches rugueuses (M.Fernandez-Prada, 2003).

ESPECE	COLONIE
<i>B. melitensis</i>	Lisse
<i>B. abortus</i>	Lisse
<i>B. suis</i>	Lisse
<i>B. neotomae</i>	Lisse
<i>B. ovis</i>	Rugueux
<i>B. canis</i>	Rugueux

Tableau I.2a Phénotypes observés au sein des différentes espèces de *Brucella*. Reproduit de. (Walque, 1999).

I.3.2 Système de régulation à deux composantes BvrR/BvrS.

Le système de régulation à deux composantes BvrR/BvrS (*Brucella* virulence related regulatory protein/*Brucella* virulence related sensor) joue un rôle dans la pénétration et le trafic intracellulaire en cellules HeLa et en macrophages en inhibant la progression du phagosome de *Brucella* dans la voie conduisant à la fusion phago-lysosomale (pour revue (Lopez-Goni et al., 2002)).

La partie senseur du système, BvrS, perçoit les modifications environnementales et les transmet à la partie régulatrice, BvrR, qui va médier les changements d'expression génomique d'au moins 2 protéines de membranes externes (Omp3a, Omp3b) (pour revue (Lopez-Goni et al., 2002)).

I.3.3 Le système de sécrétion de type IV, *virB*.

L'opéron code pour le système de sécrétion de type IV (SST4). Ce système de sécrétion est un descendant de la machinerie de conjugaison bactérienne qui permet la sécrétion de macromolécules effectrices au travers de l'enveloppe bactérienne (Christie, 2001). Chez *Brucella*, les mutants de cet opéron montrent une perte de capacité à se répliquer intracellulairement (Boschiroli et al., 2002) et à atteindre leur niche de réplication (Delrue et al., 2001). Il a également été montré que l'intégrité de cet opéron est requise pour l'entrée de *Brucella* dans les macrophages (Kim et al., 2002).

I.3.4 Cyclic α -1,2-glucans (Briones et al., 2001).

Les cyclic α -1,2-glucans des homopolymères de glucoses localisés dans le compartiment périplasmique. Ce polysaccharide est synthétisé par un mécanisme comprenant notamment la cyclic glucan synthase (Cgs), protéine de membrane interne. Il est produit par *Brucella* mais également par d'autres membres du sous-groupe des α -2 des protéobactériacae tels que *Rhizobium* et *Agrobacterium*. Chez ces espèces, les mutants pour la Cgs présentent un défaut d'assemblage du flagelle. Cela suggère que chez *Brucella* cette enzyme pourrait présenter d'autres fonctions que la synthèse de sucres.

Le rôle des cyclic α -1,2-glucans dans le trafic intracellulaire de *Brucella* n'est pas encore clairement défini. Cependant, Moreno a récemment écrit dans une revue (Moreno and Moriyon, 2002) que ce sucre serait capable de séquestrer le cholestérol dans les membranes du phagosome et ainsi empêcher la progression de celui-ci vers la fusion avec les lysosomes.

I.4. Le genre *Brucella*.

Le genre *Brucella* est constitué de 6 espèces dont certaines sont divisées en biovars. Les premières analyses de la variabilité génomique ont été réalisées par «restriction fragment length polymorphism (RFLP)» (Vizcaino et al., 2000). Les différentes espèces affichent un degré de différence de l'ADN de l'ordre de 10%.

En effet, la publication des génomes de *B. suis* (Paulsen et al., 2002) et *B. melitensis* (DeIvecchio et al., 2002) et leur comparaison a permis d'identifier 33 régions uniques d'une taille supérieure à 100 paires de bases, 22 pour *B. suis* et 11 pour *B. melitensis* (Tableau I.3) (Paulsen et al., 2002). Ces différences pourraient dans l'un et l'autre génome expliquer le fait que chaque espèce présente une spécificité d'hôte particulière.

Le polymorphisme dans les génomes des espèces de *Brucella* a également été décrit pour les séquences d'insertion (Vizcaino et al., 2000), les séquences d'ADN connues (Vizcaino et al., 2000) et de locus génomique particulier (Vizcaino et al., 2001) comme nous allons le décrire ci-dessous.

Coordinates		Size, bp	ORFs in region*		Putative function(s)
<i>B. suis</i>	<i>B. melitensis</i>		Partial ORFs	Intact ORFs	
Unique <i>B. suis</i> regions					
Chromosome 1					
1830260-1830371	163542	111	BR1895		Cell division protein, FtsK
1782549-1786501	207313	3952	BR1855	BR1852-BR1854	Transposase, hypothetical, conserved hypothetical (2)
1618082-1618926	370350	844		BR1671-BR1673	Transposase (2), HlyD family secretion protein
1568658-1568890	419471	232	BR1622		OMP31-like outer membrane protein
1158710-1158859	829930	149			
1050997-1051159	937906	162			
1030464-1031244	957888	780	BR1059, BR1060		HlyD family protein, Multidrug-resistance transporter
924517-927170	1061223	2653	BR0951	BR0952-BR0955	Amino acid ABC transporter-binding protein, hypothetical, ABC transporter-permease (2), putative GST
581357-584895	1401689	3538		BR0588-BR0593	Hypothetical, conserved hypothetical (3), major capsid protein, protease
408365-408478	1574445	113	BR0404		Glycyl-tRNA synthetase, beta subunit
397748-398173	1584637	425	BR0391	BR0389, BR0390	Hypothetical
366793-366928	1615531	135	BR0355		Hydroxypyruvate reductase
271721-271883	1710693	162			
233098-233272	1769806	174	BR0221		Transcriptional regulator
Chromosome 2					
157505-158033	1112570	528		BRA0173	Outer membrane protein
343385-361675	927290	18,290		BRA0362-BRA0379	Phage integrase, DNA-binding protein, RepA, trbL, trbJ, traC, traJ, tral, hypothetical (8), conserved hypothetical, DnaJ
521895-522864	767132	969	BRA0541, BRA0542		Hypothetical, NAD-dependent epimerase family
610838-618576	679160	7738	BRA0630, BRA0636	BRA0631-BRA0635	Oxidoreductase, amino acid ABC transporter-binding protein (2), transcriptional regulator, b-ketoadipyl CoA thiolase, conserved hypothetical (2)
731653-732234	566167	581	BRA0749, BRA0750		ABC transporter-permease
889144-889843	409215	699	BRA0907		Conserved hypothetical
1062798-1062987	236185	189	BRA1080		Dipeptide ABC transporter-permease
1082827-1083058	216360	231	BRA1096		Transcriptional regulator
Unique <i>B. melitensis</i> regions					
Chromosome 1					
1766571	222996-223107	107			Propionyl-CoA carboxylase beta chain
1161964	826061-826825	764	BMEI0801		Phage-related DNA binding protein
1055172	933462-933738	276	BMEI0899		
1050978	937920-938199	238			
776056	1209608-1210453	845		BMEI1163, BMEI1164	Transposase
383374	1598986-1599091	105	BMEI1555	BMEI1554	Transporter, MFS superfamily
219685	1783211-1783405	194	BMEI1742		ABC transporter ATP-binding protein
79687	1923357-1923696	339	BMEI1873		Cell surface protein
271941	1710394-1710672	240	BMEI1659		Hypothetical
258912	1723285-1744168	20,883	BMEI1703	BMEI1674-BMEI1702	Hypothetical (24), phage integrase, transposase, conserved hypothetical (4)
Chromosome 2					
809098	688410-688518	108	BMEI0466		Tetratricopeptide repeat family

Tableau I.3 Récapitulatif des régions uniques de *B. suis* ou *B. melitensis*. Reproduit de (Paulsen et al., 2002).

I.4.1 Polymorphisme de séquences d'insertion.

Le polymorphisme génomique est également expliqué par la distribution de séquences d'insertion (ISs) le long du génome. L'utilisation de ces ISs comme sondes d'hybridations au sein des espèces de *Brucella* ainsi que leurs biovars présentent différents profils d'hybridations. Cette variabilité observée chez les espèces de *Brucella* ne permet toutefois pas d'attribuer une souche à telle ou telle espèce ou biovar. Ces éléments mobiles tels que les ISs peuvent introduire de nombreux polymorphismes dans le génome bactérien (Vizcaino et al., 2000).

I.4.2 Polymorphisme de séquences d'ADN connues.

La nécessité de protéines antigéniques dans le cadre de l'élaboration d'un vaccin à grandement influencé le séquençage et le clonage. Ceci a permis d'obtenir certains gènes codant notamment pour des protéines de membranes externes telles que l'OMP2a, OMP2b, OMP25 et OMP31. Ces protéines sont intéressantes pour le typage au sein du genre *Brucella*. Parmi les différentes espèces de *Brucella*, il est possible d'observer un polymorphisme à travers ces protéines (Tableau I.4). Par exemple la séquence du gène codant pour l'OMP25 présentent des variabilités allant de 2 à 5 nucléotides, à l'exception de *B. suis* qui présente une délétion de 36 pb, par rapport à *B. abortus*. L'OMP31 montre une importance particulière de par le fait qu'il est absent de l'ensemble des biovars de *B. abortus*. Cela est notamment décrit

<i>Brucella species</i> ^a	<i>Biovar</i> ^a	<i>PCR-RFLP pattern of genes</i> ^b			
		omp2a ^c	omp2b ^c	omp25 ^c	omp31 ^d
<i>B. melitensis</i> *	1	B, C	B, D, E	B	A
	2	B	E	B	A
	3	B	B, D, E	B	A
	R	B, C	B	B	A
<i>B. abortus</i> *	1	A	A	A	–
	2	A	A	A	–
	3	B	B	A	–
	4*	A	B	A	–
	5	B	B	A	–
	6	B	B	A	–
	9	B	B	A	–
	R	A	A, C	A	–
<i>B. suis</i> *	1*	D	B	A	A
	2*	E	F	A	B, C
	3	D	G	A	A
	4	D	G	A	A
	5*	F	B	A	A
<i>B. ovis</i> *	–	G	H, I, J	C	D
<i>B. canis</i> *	–	D	G	A	E, F
<i>B. neotomae</i> *	–	H	K	A	A

par Vizcaino et al. (Vizcaino et al., 2001).

Tableau I.4 Les profils PCR-RFLP des gènes codant pour les OMPs principales parmi les 6 espèces de *Brucella* et leurs biovars. R \blacksquare souche rugueuse. Reproduit de (Vizcaino et al., 2000).

I.5. Un locus de 25 kpb est absent chez *B. abortus*.

Vizcaino *et al.* (Vizcaino et al., 2001) ont mis en évidence la délétion d'un locus génomique de 25 kpb présent chez *B. melitensis* et les autres espèces de *Brucella* à l'exception de *B. abortus*. Au cours de leur caractérisation du locus, ils ont identifié 22 ORFs hypothétiques. Ce fragment contient également l'*omp31*, codant pour une protéine immunogène de la membrane externe. Beaucoup de protéines qui pourraient être encodées par les ORFs du locus montrent des homologies significatives avec des protéines impliquées dans la synthèse d'un polysaccharide (Vizcaino et al., 2001).

Actuellement les évidences expérimentales ont montré que *B. melitensis* et *B. abortus* synthétisent les mêmes sucres (pour revue (Essenberg et al., 2002)). La présence de ces gènes soulève donc la question de l'existence potentielle d'un nouveau polysaccharide qui existerait chez *B. melitensis* et les autres espèces de *Brucella* mais pas chez *B. abortus* comme l'ont suggéré Vizcaino *et al.* (Vizcaino et al., 2001).

I.5.1 Homologues des ORFs de ce locus génomique.

Parmi les 22 ORFs identifiées, on trouve des homologies pour des ORFs ayant un rôle dans (Tableau.I.5)■

- La biosynthèse du LPS (core, antigène O)
- Le métabolisme des sucres (rhamnose, galactose, exopolysaccharide)

Afin de déterminer l'implication éventuelle des différentes protéines encodées dans le locus, une description générale de la biosynthèse d'un sucre extracellulaire est reprise ci-dessous, la synthèse d'un polysaccharide commence par la liaison d'un sucre sur l'undécaprényle qui est enchassée dans la membrane interne. Par la suite, les unités répétées sont synthétisées du côté cytoplasmique de la membrane interne grâce à des glycosyl transférases. Elles sont transférées à travers la membrane cytoplasmique par une protéine membranaire et polymérisées du côté périplasmique par une polymérase (fig I.6).

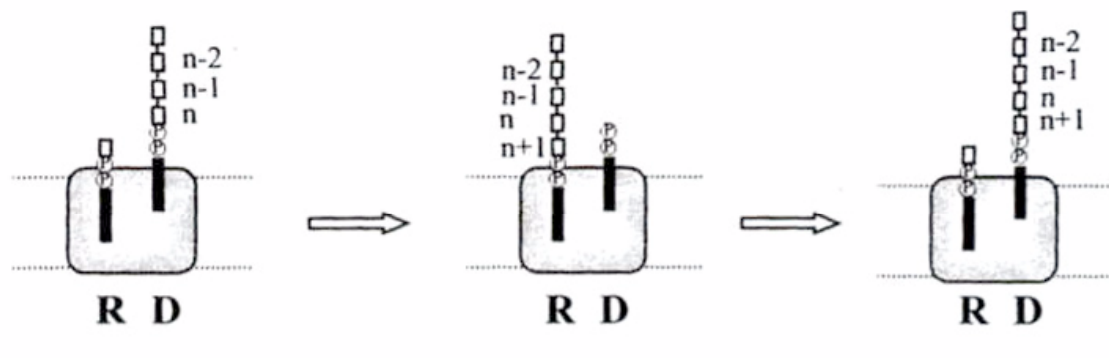


Figure I.6■ Modèle de polymérisation de la chaîne O du LPS. Les deux sites potentiels R et D permettent la fixation de l'undécaprényle. La polymérisation se déroule à l'extrémité réductrice de la chaîne O naissante par transfert de celle-ci sur la nouvelle unité au site R. La chaîne nouvellement synthétisée est alors repositionnée au site D et une nouvelle unité se fixe au niveau du site R. Reproduit de [Godfroid, 1998 #83]

L'ORF BMEII0831 pourrait coder pour une enzyme qui catalyse le transfert du premier sucre sur l'undécaprényle qui est située dans la membrane cytoplasmique. Six protéines hypothétiques (BMEII0835, 0837, 0840, 0845, 0846) présentent des homologies pour des glycosyl transférases. Chaque type de liaison entre les unités d'un polysaccharide nécessite une transférase spécifique. Cela veut donc dire que le polysaccharide synthétisé pourrait être composé d'au moins six unités différentes si chacune de ces glycosyl transférases intervenait dans sa biosynthèse.

Il y a également de nombreuses protéines homologues à des protéines de transport à travers les membranes. BMEII0838 coderait pour une protéine localisée en membrane qui présente des homologies avec *wzx* d'*E.coli* et *exoT* de *R. meliloti*. *exoT* et *wzx* jouent un rôle dans la biosynthèse et l'exportation d'un exopolysaccharide, le succinoglycan. *R. meliloti* est capable de métaboliser 2 exopolysaccharides, le succinoglycan et l'EPSII. Le succinoglycan est requis pour l'invasion des racines des légumineuses (Frayssé et al., 2003). *exoT* synthétiserait des dimères de sous unités octasaccharidiques qui constituent le succinoglycan (Gonzalez et al., 1998). Chez *E.coli*, *wzx* joue le rôle d'une «flippase» qui transloque les sous unités d'antigène-O à travers la membrane externe, il pourrait toutefois jouer un autre rôle (Rick et al., 2003). Chez *B. melitensis*, cette protéine hypothétique pourrait sur base des homologies de séquences transporter le polysaccharide hypothétique à travers la membrane cytoplasmique, comme il a été montré pour d'autres bactéries. C'est le cas pour l'OMP Wza encodée dans un cluster de gènes responsable de la synthèse de l'acide colanique chez *E.coli* et *Salmonella enterica* [Vizcaino, 2001 #1].

Toutefois pour que ces gènes donnent lieu à un polysaccharide, il faudrait que celui-ci soit exporté à travers le périplasma et la membrane externe. Trois protéines à localisations périplasmiques (BMEII0834, 0841, 0850) pourraient remplir ce rôle. En effet, BMEII0851 code pour une protéine qui possède des homologies avec *exoF* de *Rhizobium* qui participe au transport du succinoglycan au travers du périplasma (Gonzalez et al., 1998).

Depuis le périplasma, le polysaccharide pourrait également être exporté à l'extérieur par l'OMP31 qui est une protéine de la membrane externe.

De plus *lpsB* (BMEII0845) possède des homologies avec *lpsB* de *S. meliloti* et *lpcC* de *R. leguminosarum*. Ces protéines jouent un rôle dans la biosynthèse du lipide A. *lpsB* est une mannosyl transférase tout comme *lpcC* qui incorpore du mannose dans le LPS naissant (Kanipes et al., 2003).

L'ensemble de ces données suggèrent que ces protéines hypothétiques pourraient donner lieu à un polysaccharide inconnu non synthétisé chez *B. abortus*.

VOIE METABOLIQUE PUTATIVE	NUMERO DE L'ORF (BMEII)	SOURCE	FONCTION PUTATIVE	EXPECTED VALUE
Biosynthèse du LPS				
1) Core	0835	A. tumefaciens C58	Glycosyl transferase	6e ⁻⁶⁹
	0840	M. loti	Glycosyl transferase	7e ⁻¹²
	0845			
2) Antigène O	0827	S. meliloti	Glucose-1-phosphate cytidyltransferase	5e ⁻⁴¹

Introduction

	0839	A. tumefaciens C58	Putative undecaprenyl-phosphate \square -N-acetylglucosaminyltransferase	$3e^{-33}$
<i>Biosynthèse de sucre</i>				
1) Rhamnose	0830	A. tumefaciens C58	DTDP-4-dehydrorhamnose 3,5 - epimerase	$1e^{-52}$
	0840	M. loti	Glycosyl transferase	$7e^{-12}$
2) Galactose	0832	A. tumefaciens C58	UDP-glucose-epimerase	$1e^{-120}$
3) Exopolysaccharide	0836	A. tumefaciens C58	DTDP-4-dehydrorhamnose 3,5 - epimerase	$8e^{-90}$
	0838	A. tumefaciens C58	Succinoglycan biosynthetic transport protein <i>exoT</i>	$1e^{-105}$
	0843	A. tumefaciens C58	Putative colanic acetyl transferase	$2e^{-47}$
	0844	A. tumefaciens C58	KDA ,outer membrane immunogenic protein precursor	$4e^{-16}$
	0846	A. tumefaciens C58	Glycosyl transferase	$1e^{-130}$
	0847	A. tumefaciens C58	Glycosyl transferase	$1e^{-110}$
	0850	R. leguminosarum	GDP-fucose-synthetase	$1e^{-110}$
	0831	A. tumefaciens C58	Protein hypothetic	$1e^{-140}$
	0833	A. tumefaciens C58	Protein hypothetic	$6e^{-69}$
	0834	E.coli	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	$3e^{-45}$
	0837	S. meliloti	Glycosyl transferase	$4e^{-14}$
	0841	A. tumefaciens C58	Protein hypothetic	$1e^{-130}$
	0842	A. tumefaciens C58	Protein hypothetic	$1e^{-129}$
	0848	S. meliloti	GDP-mannose 4,6-dehydratase	$1e^{-18}$

Tableau 1.5 Fonctions hypothétiques des ORFS présentent dans le locus de *B. melitensis* ainis que leurs implications dans les voies métaboliques. Abréviations des genres comme suit \square A, *Agrobacterium* \square C, *Caulobacter* \square E, *E.coli* \square R, *Rhizobium* \square

II. But et stratégies du mémoire.

La question principale de ce mémoire est de déterminer si les ORFs présentes dans le locus génomique de 25 kpb¹, identifié par Vizcaino *et al.* (Vizcaino et al., 2001), sont cryptiques. Afin d'y répondre, nous avons utilisé 2 approches■

1) Une analyse directe de l'expression des ORFs *in vitro* par RT-PCR².

2) Une analyse indirecte de l'expression de ces mêmes ORFs *ex vivo*. Cette stratégie implique la mutation des ORFs d'intérêt ainsi que l'observation de la virulence des différents mutants. Si la virulence d'un mutant est atteinte cela signifie que l'ORF mutée est nécessaire à la virulence de *B. melitensis* 16M et est par conséquent exprimée.

Dans l'introduction, nous avons montré que ce locus de 25 kbp de *B. melitensis* 16M est constitué de 22 ORFs dont la majorité code pour des protéines présentant des homologies avec des protéines impliquées dans la biosynthèse de polysaccharides chez d'autres bactéries (Tableau I.5). Actuellement, les évidences expérimentales ont montré que *B. melitensis* et *B. abortus* synthétisent les mêmes sucres (pour revue (Essenberg et al., 2002)). La présence de ces gènes soulève donc la question de l'existence potentielle d'un nouveau polysaccharide qui existerait chez *B. melitensis* et non chez *B. abortus* comme l'ont suggéré Vizcaino *et al.* (Vizcaino et al., 2001). Nous avons donc ciblé notre analyse de l'expression de ce locus de 25 kbp sur les ORFs encodant ces protéines (Tableau II.1). Ce choix a également été réalisé dans la perspective, si nous démontrons que ces ORFs ne sont pas cryptiques, de pouvoir caractériser l'implication de ces ORFs dans le métabolisme des polysaccharides chez *B. melitensis* 16M.

VOIE METABOLIQUE PUTATIVE	NUMERO DE L'ORF (BME)	SOURCE	FONCTION PUTATIVE	EXPECTATION VALUE
<i>Biosynthèse d'exopolysaccharide</i>	0831	A. tumefaciens C58	Protéine hypothétique	1e ⁻¹⁴⁰
	0833	A. tumefaciens C58	Protéine hypothétique	7e ⁻⁹³
	0837	S. meliloti	Glycosyl transferase	4e ⁻¹⁴
	0838	A. tumefaciens C58	Exopolysaccharide export protein	1e ⁻¹⁰⁵
	0846	A. tumefaciens C58	Glycosyl transferase	1e ⁻¹³⁰
	0847	A. tumefaciens C58	Glycosyl transferase	1e ⁻¹⁰⁰

¹ Kilo paire de base

² Reverse transcriptase – polymerase chain reaction

	0848	S. meliloti	GDP-mannose 4,6-déhydratase, biosynthèse du GDP fucose	$1e^{-18}$
	0851	A. tumefaciens C58	Exopolysaccharide production protein exoF precursor	$2e^{-77}$
	0835	A. tumefaciens C58	Glycosyl transferase	e^{-69}
<i>Biosynthèse du core</i>	0840	M. loti	Glycosyl transferase	$7e^{-12}$
	0845	A. tumefaciens C58	Glycosyl transferase	$8e^{-85}$

Tableau II.1: Brève présentation des ORFs de *B. melitensis* 16M sélectionnées

III. Résultats.

III.1. Analyse de l'expression des ORFs *in vitro*.

Afin de déterminer si les ORFs reprises dans le tableau II.1 sont exprimées *in vitro*, des RT-PCR ont été réalisées sur de l'ARN total extrait de cultures en milieu riche de *B. melitensis* 16M.

La RT-PCR est une des techniques les plus sensibles qui permet de détecter un petit nombre de copies d'un ARNm. Celle-ci est composée de 2 étapes■

- 1) Une rétrotranscription (RT) de l'ARNm, à partir d'un oligonucléotide complémentaire à l'ARNm, avec une transcriptase inverse (Superscript II RNase Reverse Transcriptase, Gibco BRL). Cette étape aboutit à la production d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) de l'ARNm.
- 2) Une PCR qui permet l'amplification de l'ADNc à partir d'un couple d'oligonucléotides.

Tous les oligonucléotides que nous avons utilisés sont décrits dans le tableau V.1 du matériel et méthodes.

III.1.1 Extraction de l'ARN bactérien.

L'ARN total a été extrait chez des bactéries en phase de croissance exponentielle dans du milieu 2YT. Les détails pratiques de la manipulation sont décrits dans le matériel et méthodes au point V.4.1.3. Afin de déterminer la qualité de l'ARN total récupéré, nous avons déposé un échantillon de la préparation d'ARN sur un gel d'agarose 1,2%. Suite à la migration électrophorétique, l'observation des 2 sous unités ribosomique 16S et 23S est possible, ainsi que de l'ARN messager répétitif (ARNm) et de l'ADN génomique (ADNg) contaminant (Fig.III.1).

La préparation d'ARN bactérien a ensuite été traitée à la DNase dans le but d'éliminer l'ADNg. Les détails plus pratiques de cette manipulation sont décrits au point V.4.1.5 du matériel et méthodes. Afin de déterminer si le traitement à la DNase a permis d'éliminer l'ADNg contaminant, des PCRs contrôles ont été réalisées sur de l'ARN total traité à la DNase sans reverse transcription avec les couples d'oligonucléotides permettant l'amplification d'un fragment interne des ORFs d'intérêt. Ce contrôle a été réalisé lors de chaque RT-PCR, c'est pourquoi les résultats de ces contrôles seront présentés avec les résultats des différentes RT-PCR que nous décrirons dans la suite de ce travail.

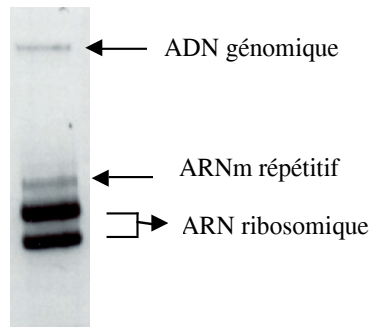


Figure III.1: Migration électrophorétique en gel d'agarose 1.2% de 1/40^{ème} d'une préparation d'ARN total de *B. melitensis* 16M cultivée en milieu riche. Cette image est représentative des différents extraits d'ARN total que nous avons réalisés au cours de ce travail.

III.1.2 Mise au point des RT-PCR.

Afin d'optimiser les RT-PCR, nous avons déterminé les paramètres suivants■

- 1) La quantité d'ARN total à engager.
- 2) La multiplicité des oligonucléotides à utiliser en RT.

III.1.2.1 Quantité d'ARN bactérien à engager.

La quantité d'ARN total bactérien, préparé comme décrit ci-dessus, a été déterminée par spectrophotométrie (voir point V.4.1.4 dans le matériel et méthodes).

Dans la littérature, nous avons observé que les quantités d'ARN total bactérien engagé en RT-PCR varient de 0,5 à 10 µg (Broceno et al., 1999; Guacucano, 2000). Afin de fixer dans notre protocole de RT-PCR la quantité d'ARN total à utiliser, nous avons donc décidé de réaliser des RT-PCR sur 4 quantités différentes d'ARN total de *B. melitensis* 16M à savoir 5 µg■ 2,5 µg■ 1,25 µg et 0,625 µg. Lors de cette expérience, nous avons utilisé une préparation dont la concentration est de 150 µg d'ARN/ml. Nous avons également décidé d'effectuer cette mise au point en détectant un fragment interne de l'ARNm de l'ORF *L7/L12* encodant pour une protéine la sous-unité 50S du ribosome qui est exprimée de manière constitutive chez *B. melitensis* 16M (Gudkov, 1997).

Lors de la RT, nous avons utilisé l'amorce forward (F) spécifique de l'ORF *L7/L12*. Lors de la PCR, nous avons utilisé le couple d'oligonucléotides permettant l'amplification d'un fragment interne (400 pb) de l'ORF *L7/L12*. Pour contrôle du bon déroulement de l'étape de PCR, celle-ci a aussi été réalisée sur de l'ADNg de *B. melitensis* 16M avec le même couple d'oligonucléotides. Le tableau III.2. résume les volumes qui ont été modifiés dans les différentes RT-PCR. Les quantités des différents réactifs de la RT-PCR n'ont pas été modifiées et sont reprises dans le point V.4.2 du matériel et méthodes.

Résultats

Après chaque RT-PCR, un échantillon du test, un du contrôle PCR sur ARN traité à la DNase et un du contrôle positif de PCR ont été déposés sur gel d'agarose. Les résultats de cette mise au point sont présentés à la figure III.2.

	5 µg d'ARN total	2,5 µg d'ARN total	1,25 µg d'ARN total	0,625 µg d'ARN total
Volume (Vol.) d'ARN (µl)	44	25	12,5	6,75
Vol. final de la RT (µl)	50	30	20	10
Vol. de RT engagé en PCR (µl)	12,5	7,5	5	2,5
Vol. final de la PCR	50	50	50	50

Tableau II.1: Tableau récapitulatif des volumes critiques engagés dans les RT-PCR qui ont été réalisés en fonction de la concentration d'ARN total engagé dans l'expérience. de la concentration d'ARN total engagé dans l'expérience.

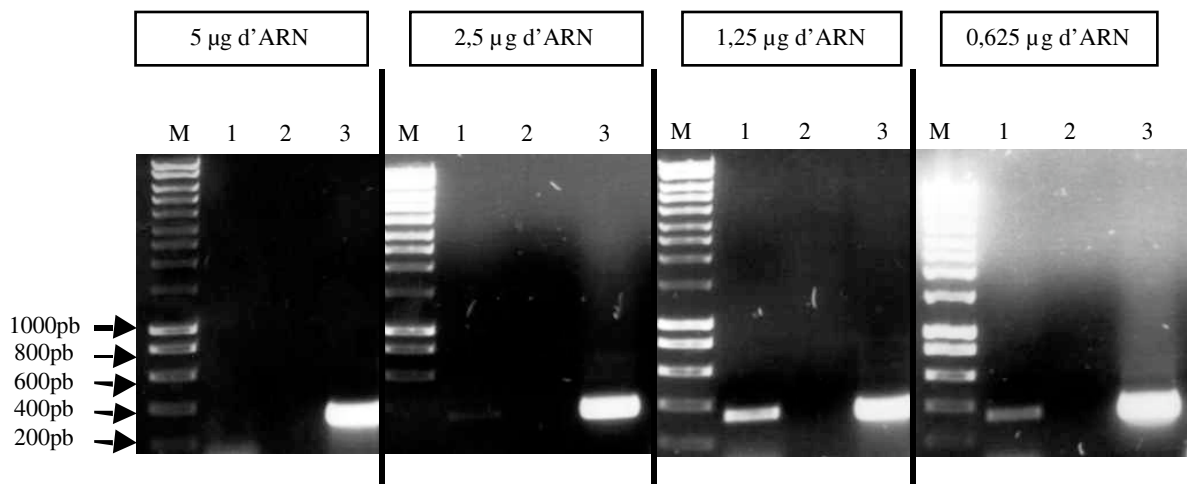


Figure III.2: Migration électrophorétique de 1/5^{ème} des produits d'amplification du fragment interne de *L7/L12* obtenus lors des RT-PCR réalisées sur différentes quantités d'ARN bactérien.

M: marqueur de taille (Bioline).

1 : RT-PCR.

2 : PCR sur de l'ARN traité à la DNase sans rétrotranscription

3 PCR sur ADNg

Comme nous pouvons le voir sur la figure III.2, les contrôles de la RT-PCR sont bons: aucune amplification n'a été obtenue dans le contrôle PCR sur de l'ARN traité à la DNase alors que le couple d'oligonucléotides permet une amplification en PCR du fragment interne désiré sur de l'ADNg. Nous pouvons également voir que nous obtenons une amplification de l'ARNm de *L7/L12* lorsque 1,25 µg et 0,625 µg d'ARN sont engagés en RT-PCR. Notons qu'étant donné qu'aucune amplification n'est détectée sur de l'ARN traité à la DNase, cette amplification résulte bien de l'ADNc. Par contre, aucune amplification du fragment interne de *L7/L12* n'a été détectée lorsque 2,5 µg et 5 µg d'ARN sont utilisés.

En conclusion, la quantité d'ARN de *B. melitensis* 16M qui sera engagé dans les RT-PCR a été fixée à 1,25 µg.

Discussion des résultats.

Les résultats que nous avons obtenus en fonction de la concentration en ARN qui a été engagée en RT-PCR pourraient être sujet à controverse. En effet, une amplification RT-PCR du fragment *L7/L12* proportionnelle à l'ARN engagé en RT-PCR est observée pour les deux petites quantités d'ARN. Par contre, lorsqu'une quantité supérieure à 1,25 µg d'ARN est utilisée, aucune amplification de l'ARNm de *L7/L12* n'est détectée. Plusieurs explications sont proposées:

- Dans le manuel de la transcriptase inverse, le volume final de RT conseillé est de 20 µl. Or pour obtenir une concentration en ARN de 5 µg avec notre préparation d'ARN, nous avons dû effectuer la RT dans un volume plus de 2 fois supérieur (Tableau III.1). La quantité d'enzyme que nous avons utilisée pour chaque RT correspond par contre à celle conseillée pour un volume final de 20 µl. On peut donc imaginer que la quantité d'enzyme utilisée pour les grandes quantités d'ARN était trop faible.
- L'augmentation de volume d'ARN engagé en RT-PCR pourrait amener de plus grandes quantités des inhibiteurs présents dans les extraits d'ARN. En effet, en augmentant la quantité d'ARN dans l'étape de RT, nous avons diminué le facteur de dilution des inhibiteurs potentiels (Tableau III.1).
- Dans chaque PCR, nous avons engagé 1/4 du volume de la RT. Or, le volume conseillé par le manuel de la transcriptase inverse correspond à un 1/10 de la RT, donc 2 µl pour un volume final de RT de 20 µl ou 5 µl pour un volume final de RT de 50 µl. Nous avons donc mis 4 fois plus. Il est souligné dans ce même manuel qu'augmenter le volume de RT dans la PCR peut donner l'effet inverse de celui escompté à savoir une diminution de l'efficacité de la PCR.

III.1.2.2 Complexité des oligonucléotides lors de la RT.

Afin de pouvoir analyser à partir d'une même RT l'expression de plusieurs ORFs d'intérêt, nous avons déterminé le nombre d'oligonucléotides spécifiques utilisables lors de la RT. Comme ci-dessus, nous avons effectué la mise au point en détectant l'ARNm de l'ORF *L7/L12*. L'amplification du fragment interne de l'ORF *L7/L12* a donc été évaluée sur de l'ARN rétro transcrit à partir de:

- 1) Un oligonucléotide F spécifique d'une ORF d'intérêt ainsi que l'oligonucléotide F contrôle de l'ORF *L7/L12*.
- 2) Un mélange de deux oligonucléotides F spécifiques de deux ORFs d'intérêt différentes ainsi que l'oligonucléotide F contrôle.
- 3) Une amorce aléatoire de type hexamère.

La concentration en oligonucléotides utilisé est de 20 µM pour un volume total en oligonucléotides de 2 µl. La quantité d'ARN de *B. melitensis* 16M engagé en RT est de 1,25 µg comme déterminé ci-dessus. L'amplification PCR du fragment interne de *L7/L12* a été réalisée sur 1/4 de chaque RT. Après chaque RT-PCR, un échantillon du test, un du contrôle PCR sur ARN traité à la DNase et un du contrôle positif de PCR ont été déposés sur gel d'agarose. Les résultats de cette mise au point sont présentés à la figure III.3.

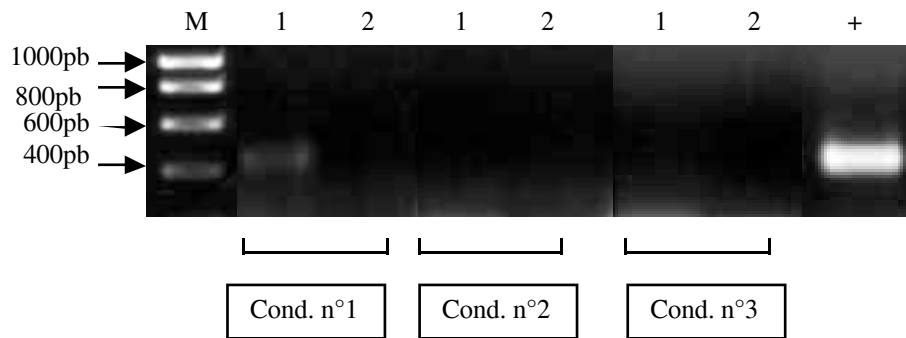


Figure III.3: Migration électrophorétique des amplifications PCR du fragment interne de l'ORF *L7/L12* pour les différentes conditions testées. Pour la cond. n°1, la RT a été réalisée avec une amorce F spécifique d'une ORF d'intérêt ainsi que l'amorce F contrôle *L7/L12* pour la cond. n°2, un mélange de 2 amorces F spécifiques de deux ORFs d'intérêt ainsi que l'amorce F contrôle. Dans la cond. n°3, par contre, la RT a été réalisée avec une amorce aléatoire de type hexamère.

1■ RT-PCR

2: PCR avec le couple d'oligonucléotides de l'ORF *L7/L12* sur de l'ARN traité à la DNase sans rétro transcription.

+: Contrôle positif avec le couple d'oligonucléotides de l'ORF *L7/L12* sur de l'ADNg de *B. melitensis* 16M.

Comme nous pouvons le voir sur la figure III.3, une amplification de l'ARNm de *L7/L12* est observable. Par contre, l'utilisation en RT de plusieurs oligonucléotides spécifiques de différentes ORFs ne donne aucune amplification PCR du fragment interne de l'ORF *L7/L12*. De plus, l'utilisation d'une amorce aléatoire lors de la RT n'a pas fonctionné.

En conclusion, une RT indépendante pour chaque ORF à tester sera réalisée dans la suite du travail.

En conclusion de ces mises au point:

- 1) Nous avons décidé d'engager 1,25 µg d'ARN de *B. melitensis* 16M dans la rétro transcription.
- 2) Nous avons décidé d'étudier l'expression de chaque ORF d'intérêt à partir de RT indépendante réalisée sur de l'ARN bactérien avec une amorce F spécifique de cette ORF.

Le protocole de RT-PCR que nous avons défini est décrit au point V.4.2 du matériel et méthodes.

III.1.2.3 RT-PCR.

Selon les paramètres définis ci-dessus, nous avons analysé par RT-PCR l'expression *in vitro* des ORFs BMEII 0833, 0838 (*exoT*), 0844 (*omp31*)³, 0846, 0847, 0851 (*exoF*) en utilisant les oligonucléotides décrits (Tableau V.1 du matériel et méthodes) qui permettent l'amplification PCR des différents fragments repris dans la figure III.4. Les détails plus pratiques de la manipulation sont décrits dans le matériel et méthode au point V.4.2. Après chaque RT-PCR, un échantillon du test RT-PCR, un du contrôle PCR sur ARN traité à la DNase et un du contrôle positif de PCR pour l'ORF d'intérêt et pour l'ORF *L7/L12*, contrôle positif de la RT-PCR, ont été déposés sur gel d'agarose. Les résultats sont présentés à la figure III.5 et ont été répétés sur au moins 2 cultures indépendantes pour chaque ORFs d'intérêt. La figure ci-dessous reprend les régions d'ADN amplifiées en RT-PCR.

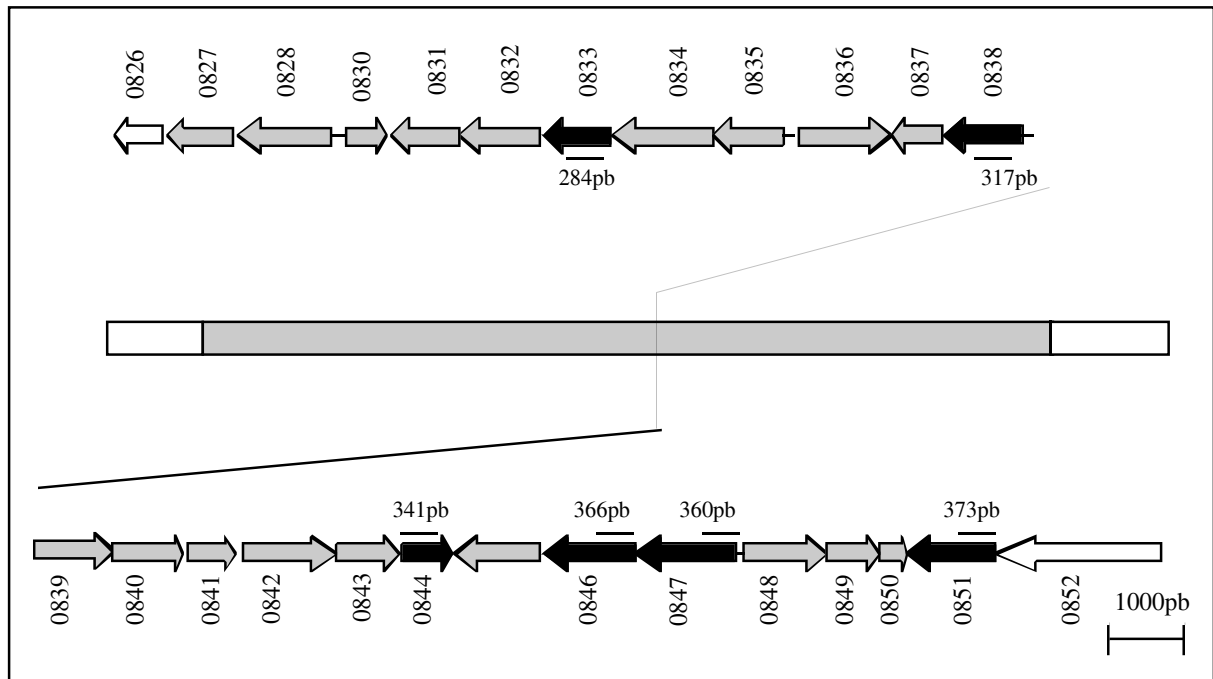


Figure III.4a Représentation schématique du locus montrant les régions d'ADN amplifiées par les couples d'oligonucléotides spécifiques aux ORFs d'intérêt. Les flèches noires représentent les ORFs pour lesquelles nous avons testé l'expression *in vitro*.

³ Bien que ne présentant aucune homologie avec des protéines impliquées dans la biosynthèse de sucres, nous avons décidé d'amplifier par RT-PCR l'ARNm du gène *omp31* car il est le seul gène du locus de 25kbp connu à ce jour pour être exprimé [Vizcaino, 1997 #27].

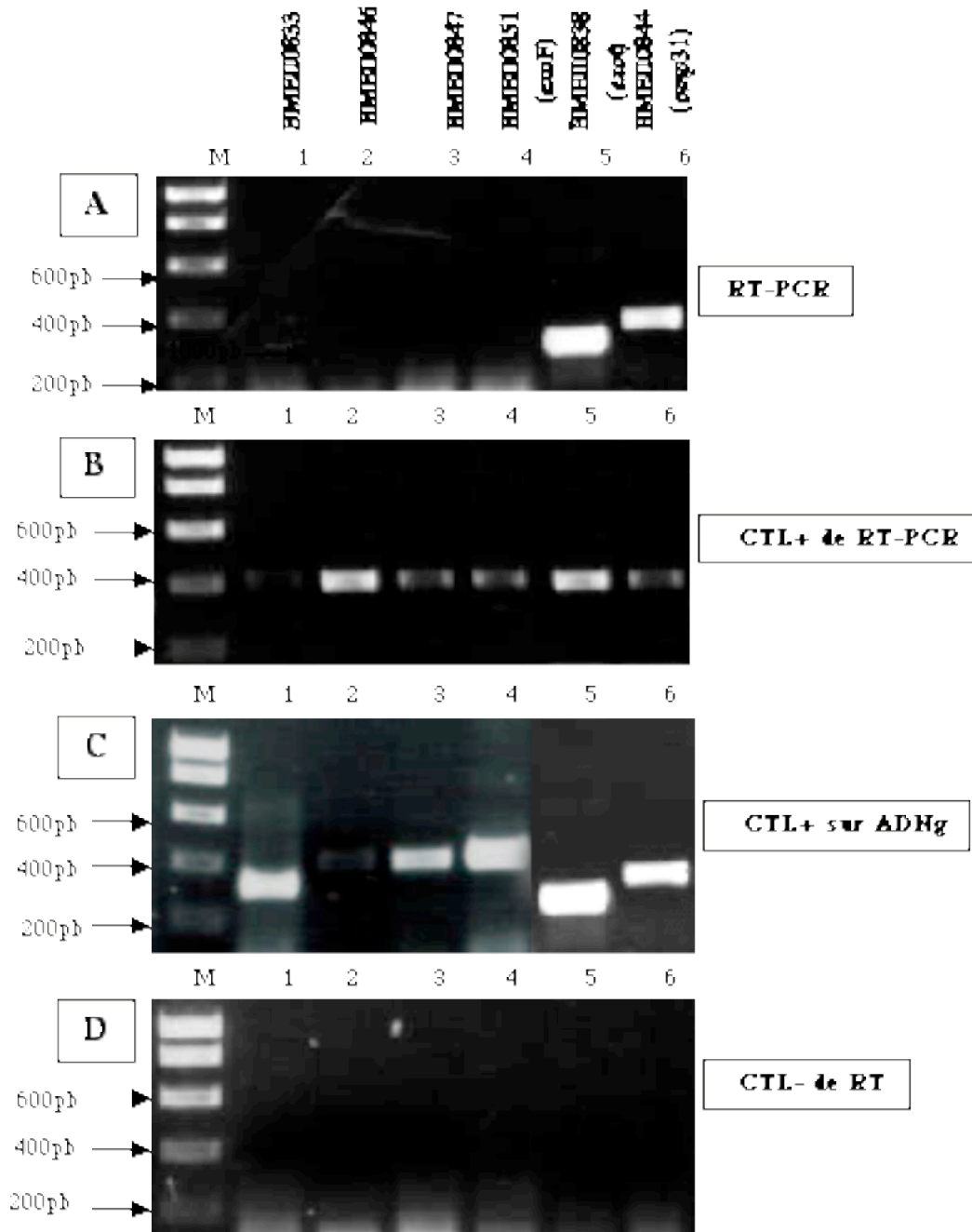


Figure III.5 Migration électrophorétique de 1/5^{ème} des RT-PCR. Les pistes correspondent respectivement aux ORFs BMEII0833, 0846, 0847, 0851 (*exoF*), 0838 (*exoT*), 0844 (*omp31*). A., amplifications des RT-PCR B, PCR réalisée avec le couple d'oligonucléotides spécifiques du fragment interne de *L7/L12* sur les échantillons de RT des différentes ORFs d'intérêt C, PCR sur ADNg avec les couples d'oligonucléotides des différentes ORFs d'intérêts. D, PCR sur ARN traité à la DNase sans RT avec les couples d'oligonucléotides des ORFs d'intérêt.

Comme nous pouvons le voir sur la figure III.5, les contrôles positifs et négatifs de l'expérience sont corrects. Une amplification en RT-PCR est observée pour l'*omp31* et *exoT*. Par contre, aucune amplification n'est observée pour les ORFs BMEII 0833, 0846, 0847, 0851 (*exoF*).

En conclusion, l'ORF BMEII0844 (*omp31*) est exprimée *in vitro* comme décrit par [Vizcaino, 1997 #27]. Nous avons également montré que l'ORF *exoT* (BMEII 0838) est exprimée en milieu riche. Par contre, les ORFs BMEII 0833, 0846, 0847, 0851 (*exoF*) ne sont pas exprimées dans le milieu riche 2YT.

Nous avons montré que l'ORF BMEII0838 (ou *exoT*) est exprimée en milieu riche 2YT. Il s'agit donc de la seconde ORF du locus de 25 kbp de *B. melitensis* 16M absent chez *B. abortus* qui est exprimée. L'ORF BMEII0838 code pour une protéine présentant des homologies avec *wzx* de *E.coli* et *exoT* de *Rhizobium meliloti*.

III.2. Analyse indirecte de l'expression des ORFs d'intérêt *ex vivo*.

À l'exception de l'ORF BMEII0838 (*exoT*), aucune des 4 autres ORFs, encodant des protéines potentiellement impliquées dans la biosynthèse des sucres, ne s'expriment dans un milieu riche de croissance bactérienne. Nous avons donc entrepris une analyse indirecte de l'expression de ces ORFs *ex vivo*. D'autres ORFs ont également été étudiées et sont reprises dans le tableau II.1. Pour rappel, cette stratégie implique la mutation des ORFs d'intérêt et l'observation de la virulence des différents mutants obtenus. Si la virulence d'un mutant est atteinte cela signifie que l'ORF mutée est nécessaire à la virulence de *B. melitensis* 16M et est par conséquent exprimée dans les conditions testées. Au cours de ce travail, nous avons évalué la survie intracellulaire des mutants de *B. melitensis* 16M dans une lignée de macrophages ovins, les MOCL3 (Olivier et al., 2001).

III.2.1. Mutagenèse par intégration disruptive.

Dans un premier temps, nous avons donc construit des mutants dans les différentes ORFs par intégration d'un plasmide dans la région 5' des ORFs. Les étapes suivantes ont été réalisées:

- 1) La construction de plasmides de disruption.
- 2) L'obtention de mutants suite au transfert conjugatif du plasmide recombinant chez *B. melitensis* 16M Nal^R à partir de cellules *E.coli* S17-1 donneuses et la validation de leur génotype en Southern blot

III.2.1.1 Construction des plasmides de disruption.

Le plasmide que nous avons utilisé est le pSKoriTKan (voir figure V.1 du matériel et méthodes). C'est un plasmide non réplcatif chez *B. melitensis* 16M. Par conséquent, la résistance à la kanamycine portée par ce vecteur ne pourra se maintenir chez *B. melitensis* 16M qu'après intégration de celui-ci dans son génome. La région de l'intégration a été sélectionnée en 5' de l'ORF d'intérêt afin de conduire à la disruption de cette ORF. Une stratégie de clonage à bouts francs au site *EcoRV* du MCS du pSKoriTKan a été adoptée.

III.2.1.1.1 Définitions des oligonucléotides.

Les oligonucléotides ont été définis de façon à amplifier un fragment interne des ORFs d'intérêt. Pour empêcher la production d'une protéine tronquée fonctionnelle à partir de l'ATG de l'ORF, le site de recombinaison a été choisi afin qu'elle concerne la partie 5' de l'ORF d'intérêt. De même, pour empêcher la production d'une protéine tronquée fonctionnelle en aval du site d'insertion du plasmide un codon stop TGA a été rajouté du côté 3' de l'amorce reverse. Les séquences nucléotidiques des oligonucléotides sont reprises dans le tableau V.1 du matériel et méthodes.

III.2.1.1.2. Amplification PCR.

Le fragment interne de chaque ORF à disrupter a été amplifié en utilisant les oligonucléotides décrits dans le tableau V.1. L'analyse sur gel d'agarose des amplifications PCR a montré que nous avons pu amplifier les fragments internes pour 11 des ORFs sélectionnés et que la taille des amplicons correspond à la taille attendue présentée dans le tableau V.1 du matériel et méthodes pour chacun des couples d'oligonucléotides (résultats non montrés). Les produits PCR ont ensuite été purifiés et la concentration des amplicons a été estimée sur gel d'agarose comme décrit dans le matériel et méthodes (Fig.V.3.6).

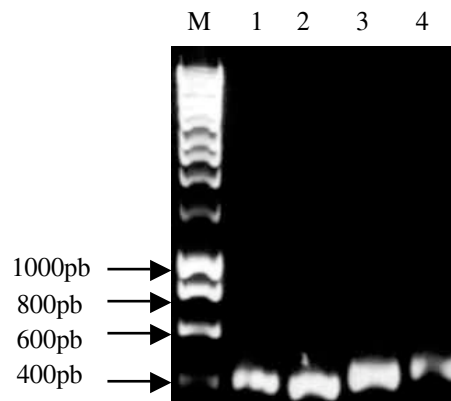


Figure III.6 Migration électrophorétique de 1/5^{ème} des produits d'amplification PCR purifiés

M : marqueur de taille (Bioline)

1, 2, 3 et 4 : Respectivement amplification de fragments internes des ORFS BMEII0835, 0845, 0846, 0831. La concentration observée est de l'ordre de 40ng/μl.

II.2.1.1.3. Clonage des amplicons dans le psKoriTKan.

Les 11 produits PCR purifiés ont été mis en présence du plasmide pSKoriTKan linéarisé par une restriction *EcoRV* dans une réaction de ligation. Les cellules *E.coli* DH10B compétentes ont été transformées par le mélange de ligation puis étalées sur le milieu sélectif LB contenant de la kanamycine ainsi que du X-gal et de l'IPTG car le psKoriTKan permet le test blanc/bleu.

III.2.1.1.4. Analyse des clones recombinants.

Une dizaine de colonies blanches ont été choisies et leur ADN plasmidique a été extrait par la méthode de minipréparation (matériel et méthode point V.3.4.). Nous avons ensuite réalisé une restriction diagnostique de l'ADN plasmidique avec *HindIII* (HIII) afin de déterminer si les plasmides contiennent un insert. En effet, les inserts ne contenant pas de site HIII, une restriction HIII du pSKoriTKan libère deux fragments un de 2029 pb et l'autre contenant le MCS de 2100 pb dont la taille peut varier si un insert a été cloné dans le MCS du pSKoriTKan (Figure III.7). Un exemple de résultats est montré à la figure III.8.

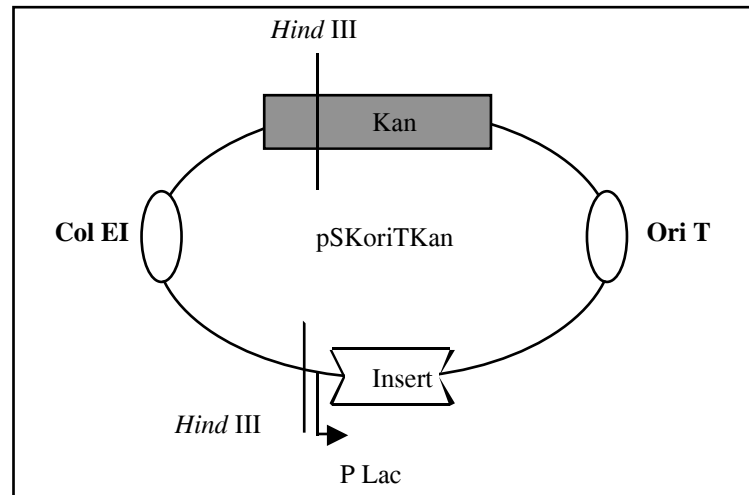


Figure III.7: Représentation schématique d'une restriction *Hind* III sur un pSKoriTKan. On obtient 2 fragments, un fragment constant de 2029 pb et un fragment variable de 2100 pb auquel s'ajoute 300 à 400 pb (la taille de l'insert).

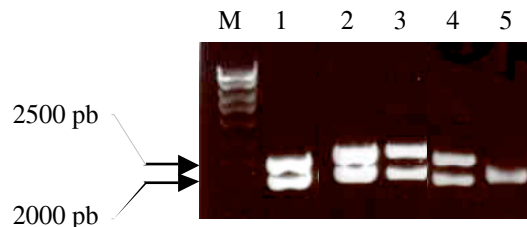


Figure III.8: Migration électrophorétique de l'ADN plasmidique de la construction disruptive pour l'ORF

M ■ Marqueur de taille (Bioline).

1, 2, 3, 4 ■ Le profil attendu d'un plasmide contenant respectivement bien un insert pour le psK0831, 0833, 0845, 0846 est une bande à 2000 pb et 2500 pb.

5 ■ Restriction du pSKoriTKan vide, une seule bande correspondant à 2 bandes de 2000 et 2100pb.

Sur base des profils de restriction, nous avons identifié au moins un plasmide recombinant pour 10 des 11 ORFs d'intérêt. En effet, tous les plasmides candidats recombinants pour le fragment interne de l'ORF BMEII0838 (*exoT*) ne possédaient aucun insert. Ces plasmides ont été appelés pSKX-Y où X signifie le numéro de l'ORF et Y le numéro des différents plasmides recombinants pour cette ORF.

III.2.1.1.5 Détermination du sens de l'insert par rapport au promoteur de *lacZ'* (*Plac*).

En plus d'ajouter un codon stop dans l'oligonucléotide reverse pour empêcher la production d'une protéine fonctionnelle en aval du site d'insertion, nous avons décidé de sélectionner les plasmides recombinants pSKX contenant le fragment interne de chaque ORF cloné dans le sens opposé du *Plac*. Nous avons donc réalisé des PCR sur les plasmides sélectionnés dans le point précédent avec une amorce forward «■universel■» (F uni) s'hybridant sur le pSKoriTKan et l'amorce forward ou reverse spécifique (F sp. et R. sp., respectivement) du fragment interne de l'ORF d'intérêt cloné comme représenté à la figure III.9. Si l'insert d'intérêt se trouve dans le sens opposé du *Plac* alors, il y aura amplification avec le couple d'amorce R sp. et F uni. Nous avons sélectionné les plasmides recombinants de ce type. Un exemple d'amplification PCR se trouve à la figure III.10.

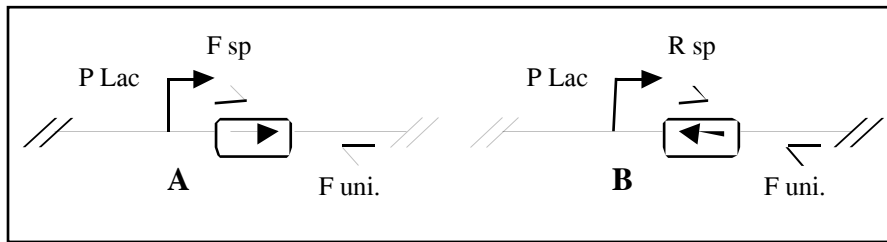


Figure III.9 Localisation des oligonucléotides sur un plasmide recombinant contenant la séquence codante du fragment de l'ORF d'intérêt A) dans le sens du *Plac* ou B) dans le sens inverse du *Plac*. F et R sp. oligonucléotide forward et reverse spécifiques F uni. oligonucléotide universel.

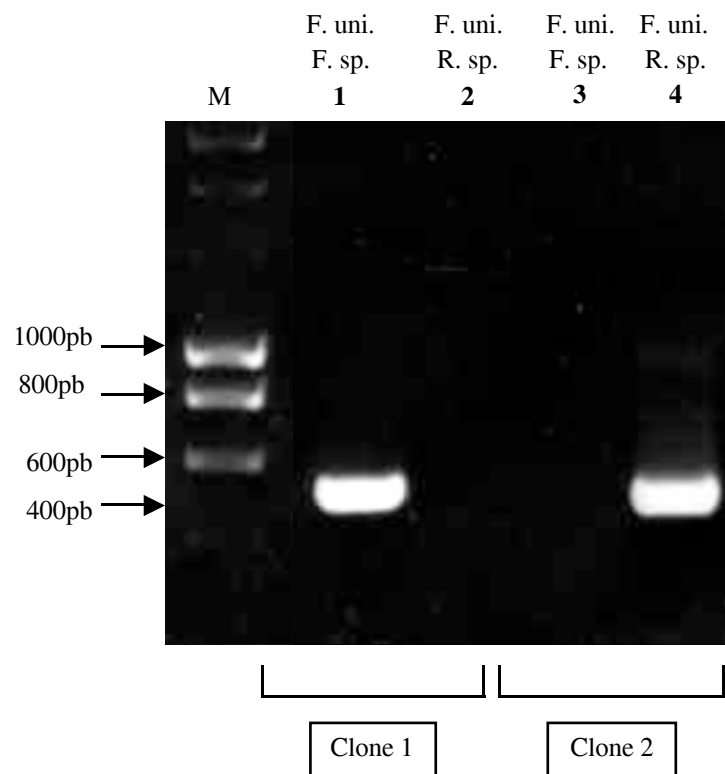


Figure III.10 Migration électrophorétique des produits d'amplification diagnostique sur deux plasmides recombinants pSK0831.

M Marqueur de taille (Bioline).

1 et 3 PCR sur pSK0831-1

2 et 4 PCR sur pSK0831-2

Comme nous pouvons le voir sur la figure III.10, une amplification PCR est détectée pour le pSK0831-1 en utilisant le couple d'oligonucléotides F. uni.-F. sp. (piste 1) ce qui signifie que le fragment interne de la séquence codante de BMEII0831 est dans le même sens que le *Plac* du pSKoriTKan. Par contre, pour le pSK0831-2, c'est le couple F. uni.-R. sp. qui permet l'amplification de l'insert cloné (piste 4) ce qui signifie que le fragment cloné est, dans ce plasmide, dans le sens opposé au *Plac*. En conclusion, le pSK0831-2 a été sélectionné pour la construction du mutant disruptif de l'ORF BMEII0831 chez *B. melitensis* 16M.

Nous avons effectué ce test sur chacun des plasmides recombinants obtenus pour les 10 ORFs. Les résultats obtenus sont repris dans le tableau III.2.

Plasmides	Sens de clonage du fragment de la séquence codante par rapport au <i>Plac</i>
pSK0831	Sens opposé
pSK0833	Sens opposé
pSK0835	Même sens
pSK0837	Sens opposé
pSK0840	Même sens
pSK0845	Sens opposé
pSK0846	Sens opposé
pSK0847	Sens opposé
pSK0848	Sens opposé
pSK0851	Sens opposé

Tableau III.2: Tableau représentatif des résultats obtenus pour la détermination du sens de clonage de l'insert dans les différentes constructions pSK.

Comme le montre le récapitulatif des résultats obtenus (tableau III.2), nous avons pu sélectionner des plasmides de disruption contenant le fragment de la séquence codante cloné dans le sens opposé du *Plac* pour 8 des 10 ORFs à muter. Par contre, parmi les plasmides recombinants pSK0835 et pSK0840, aucun ne possède le fragment de la séquence codante cloné dans le sens opposé du *Plac*. Cependant, nous avons quand même utilisé ces plasmides recombinants puisque l'expression d'un ARNm codant pour une protéine tronquée à partir du *Plac* est peu probable du fait du codon stop introduit dans l'oligonucléotide reverse.

III.2.1.2. Obtention des mutants des différentes ORFs chez *B. melitensis* 16 M.

III.2.1.2.1. Transfert conjugatif des pSK disruptifs chez *B. melitensis* 16 M.

Les 10 plasmides recombinants sélectionnés dans le point précédent ont été transformés dans la souche S17-1 de *E. coli*. Ensuite, ils ont été transférés chez *B. melitensis* 16M NaIR par conjugaison à partir d'*E. coli* S17-1 donneuse. Afin de sélectionner les événements de recombinaison homologue, le mélange de conjugaison a été déposé sur milieu sélectif contenant de l'acide nalidixique (Nal) et de la Kan. Comme le plasmide de disruption qui porte la résistance à la Kan est non-répliquatif chez *Brucella*, seules les brucellae ayant intégré le plasmide dans leur génome pourront se développer sur milieu sélectif. Une dizaine de candidats disruptants a été obtenu pour 8 ORFs d'intérêt. En effet, aucun candidat intégratif n'a poussé sur milieu sélectif pour les ORFs BMEII0837 et BMEII0847.

III.2.1.2.2. Validation des mutants d'intégration par Southern blot.

L'ADNg de 5 candidats disruptants de *B. melitensis* a été préparé pour chaque ORFs à disrupter. Il a été restreint par *Hind*III et *Eco*RI afin de permettre l'analyse en Southern blot. La sonde utilisée est la cassette kan. Avec une restriction de l'ADNg par *Hind*III, le profil d'hybridation de la sonde kan correspond à 2 fragments de tailles différentes : un fragment de 2029 pb et un fragment dont la longueur dépend de la position du site *Hind*III dans le génome de *B. melitensis* 16 M (Fig. III.11). Avec une restriction de l'ADNg par *Eco*RI, la sonde kan allume un seul fragment dont la longueur est variable selon la position des sites dans le génome (Fig. III.11). La taille des fragments attendus pour chacun des mutants intégratifs est présentée dans le tableau III.3. Un exemple de résultats de Southern blot est montré à la figure III.12, 13.

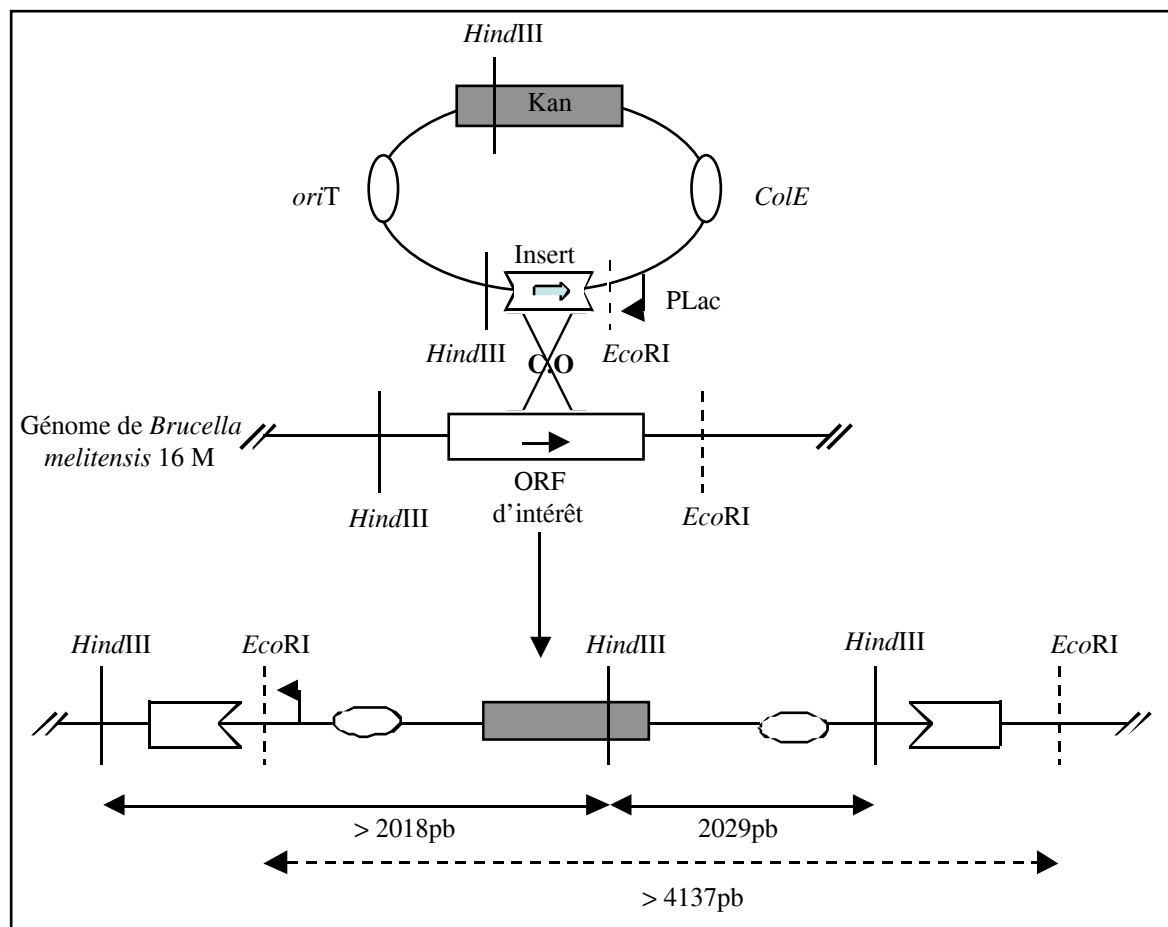


Figure III.11: Schématisation de la recombinaison homologue et profil de restriction attendu en Southern blot avec la sonde kan*. C.O : crossing over, ColEI : origine de réplication chez *E.coli* et *oriT* : origine de transfert conjugatif.

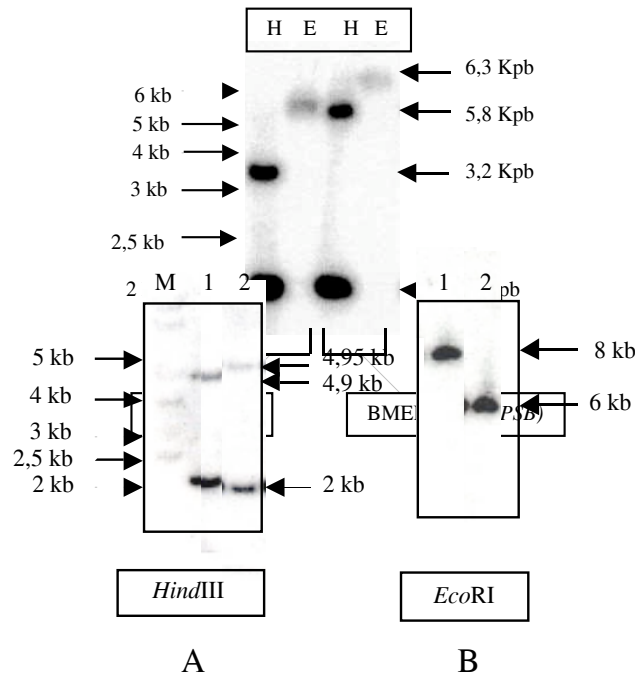


Figure III.12 Film auto radiographique du Southern blot réalisé avec une sonde kan sur l'ADNg de candidats disruptants. L'ADNg des candidats mutants a été restreint par *Hind*III (H) et par *Eco*RI (C). Les bandes attendues sur base du génome séquencé sont : pour chaque candidat, une bande constante à 2kb avec spécifiquement pour BMEI0831, une bande à 3,2kb pour BMEI0845 (*lpsB*), une bande à 5,8kb. Les bandes attendues pour *Eco* RI sont : pour BMEI0831, une bande à 6,3kb pour BMEI0845 (*lpsB*), une bande à 7kb.

Figure III.13 Film auto radiographique du Southern blot réalisé avec une sonde kan sur l'ADNg de candidats disruptants. L'ADNg.

A Restriction *Hind*III sur ADNg respectif de BMEI0846, 0851.

B Restriction *Eco*RI sur ADNg respectif de BMEI0846, 0851.

Après restriction *Hind*III, les bandes attendues sur base du génome séquencé sont : pour chaque candidat, une bande constante à 2kb avec spécifiquement pour BMEI0846, une bande à 4,7 kb pour BMEI0851 (*exoT*), une bande à 4,9 kb.

Après restriction *Eco*RI, les bandes attendues sur base du génome séquencé sont : spécifiquement pour BMEI0846, une bande à 8,1 kb pour BMEI0851 (*exoT*), une bande à 5,2 kb.

RESTRICTION <i>HIND</i> III				
	<i>Numéro d'ORFs d'intérêt (BMEII)</i>	<i>Profils d'hybridations observés (bp)</i>	<i>Profils d'hybridations attendus (bp)</i>	<i>Commentaire</i> ■ <i>Bon profil = +</i> <i>Mauvais profil = -</i>
1	0831	2000, 4000	2000, 3273	+
2	0833	2000, 3500	2000, 2881	-
3	0835 (<i>lpsE</i>)	2000, 5000	2000, 3933	-
4	0837			+
5	0840	2000, > 4000	2000, 5967	-
6	0845 (<i>lpsC</i>)	2000, 6000	2000, 5867	+
7	0846	2000, < 5000	2000, 4670	+
8	0848	2000, > 2000 , 2000 ou, 1000	2000, 6380	-
9	0851 (<i>exoF</i>)	2000, > 5000	2000, 4969	+
RESTRICTION <i>ECORI</i>				
	<i>Numéro d'ORFs d'intérêt (BMEII)</i>	<i>Profils d'hybridations observés (bp)</i>	<i>Profils d'hybridations attendus (bp)</i>	<i>Commentaire</i> ■ <i>Bon profil = +</i> <i>Mauvais profil = -</i>
1	0831	6000	6371	+
2	0833	6000	9028	-
3	0835 (<i>lpsE</i>)	/	5470	/
4	0837			+
5	0840	10000	9194	+
6	0845 (<i>lpsC</i>)	7000	7006	+
7	0846	8000	8187	+
8	0848	/	4399	/
9	0851 (<i>exoF</i>)	6000	5217	+

Tableau III.3: Tableau récapitulatif des profils d'hybridation calculés sur base du génome de *B. melitensis* 16M et des profils d'hybridation obtenus par Southern Blot.

La comparaison entre les profils d'hybridation observés en Southern blot et ceux calculés sur base du génome de *B. melitensis* 16M montre que le profil d'hybridation obtenu avec la sonde kan sur l'ADNg des candidats intégratifs pour les ORFs BME0831, BMEII0845, BMEII0846 et BMEII0851 est comparable à celui calculé pour les deux restrictions utilisées. Pour les candidats intégratifs de l'ORF BMEII0840, le profil d'hybridation, similaire pour chacun d'eux, est comparable à celui calculé sur base du génome lorsque l'ADNg est retreint par *EcoRI* par contre lorsque l'ADNg est restreint par *HindIII*, le profil d'hybridation observé n'est pas comparable à celui calculé. Pour les candidats disruptants des autres ORFs (BMEII0833, BMEII0835 et BMEII0848), aucun d'eux ne présente de profil d'hybridation observé comparable à celui calculé.

En conclusion, nous avons pu obtenir les mutants de *B. melitensis* 16M pour les ORFs BME0831, BMEII0845, BMEII0846 et BMEII0851. Un clone mutant de chacune de ces ORFs a été sélectionné pour l'analyse de leur virulence en macrophages ovins.

III.2.2.3 Infections des mutants en macrophage ovins.

Les infections de macrophages ovins ont été réalisées comme décrit dans le matériel et méthodes au point V.5. La multiplicité d'infection (MOI) et le nombre de bactéries intracellulaires 48 heures d'infection ont été évalués par la technique des colonies formants une unité (CFU). Les infections ont été réalisées en triplicats et répétées 2 fois. Les résultats sont présentés dans le tableau III.4 et la figure II.14.

Le tableau III.4. reprend les MOI réellement utilisées dans nos expériences. Nous pouvons remarquer que ces MOI sont similaires pour chacune des souches de *Brucella* dont nous voulions analyser la survie intracellulaire. De plus, nous pouvons observer qu'aucune MOI n'est pas inférieure à 270. Or, une MOI de 300 est classiquement utilisée puisqu'elle représente la MOI critique■ en dessous de cette MOI le nombre de bactéries intracellulaires est proportionnelle à la MOI■ au-dessus de cette MOI le nombre de bactéries intracellulaires ne varie plus. En conclusion, nous pouvons dire que si un défaut de survie intracellulaire est décelé chez un des mutants analysés, ce défaut ne résulte pas d'une différence dans les MOI utilisées.

SOUCHES DE <i>B. MELITENSIS</i> 16M	MOI DE L'INFECTION N°1	MOI DE L'INFECTION N°2
sauvage	420	540
BMEII0831	310	310
BMEII0845	270	420
BMEII0846	270	400
BMEII0851	320	330

Tableau III.4: Récapitulatif des multiplicités d'infection calculée pour chacun des mutants.

La période de 48h nous a permis d'évaluer la capacité des bactéries mutantes à survivre dans les macrophages en comparant le nombre de bactéries mutantes intracellulaires au nombre de bactéries sauvages intracellulaires. Comme nous pouvons l'observer sur la figure 16, aucun des mutants analysés présente un défaut de survie intracellulaire par rapport à la souche sauvage.

Au terme de notre analyse de la virulence de 4 des 22 ORFs contenues dans le locus génomique de *B. melitensis* délété chez *B. abortus*, nous pouvons dire que les ORFs BME0831, BMEII0845, BMEII0846 et BMEII0851 ne sont pas nécessaires à la survie intracellulaire de *B. melitensis* 16M

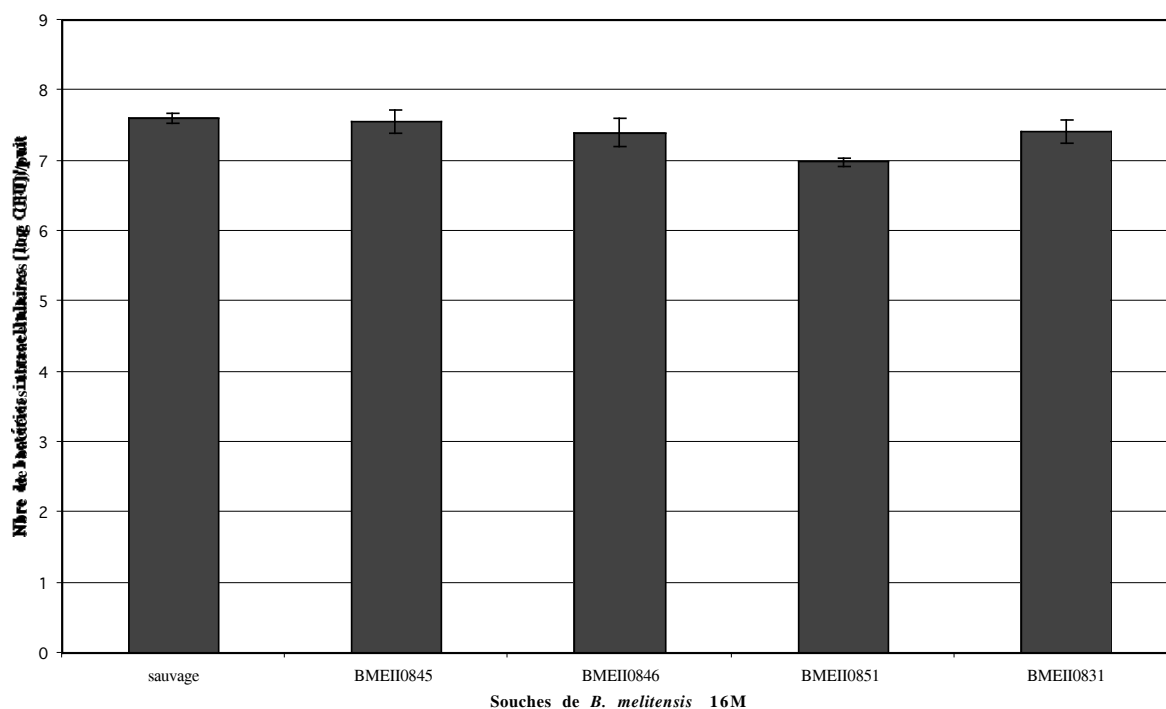


Figure III.14: Graphique illustrant les résultats de la survie intracellulaire des mutants BME0831, BMEII0845, BMEII0846 et BMEII0851 après 48 d'infection des macrophages ovins.

IV. Discussion et perspectives.

La question posée au cours de ce mémoire était de savoir si les ORFs présentent dans le locus génomique de *B. melitensis*, délété chez *B. abortus*, sont cryptiques.

IV.1 Analyse des ORFs en milieu riche.

Les résultats obtenus en RT-PCR montrent que l'ORF BMEII0838 est exprimée en milieu riche. Par contre, dans les mêmes conditions les ORFs BMEII0833, 0846, 0847, 0851 ne sont pas exprimées. Comme démontré dans la littérature, l'ORF BMEII0844 (*omp31*) est exprimée [1].

Sur base d'une analyse bio informatique, l'ORF BMEII0838 ferait partie d'un opéron avec l'ORF BMEII0837. Il serait donc intéressant d'évaluer l'expression de cette dernière ORF dans les conditions qui nous ont permis de mettre en évidence l'expression de BMEII0838.

L'homologie pour ces 2 ORFs a permis d'émettre des hypothèses quant à leur fonction respective. BMEII0838 et BMEII0837 possède respectivement des homologies pour *exoT* et *exoO* de *Rhizobium meliloti*. A l'inverse de ce qu'on a observé chez *Brucella*, ces gènes ne font pas partie d'un même opéron chez *R. meliloti*. Mais participent tous 2 à la biosynthèse du succinoglycan, ce composé sera décrit plus en détails ci-dessous.

R. meliloti est un symbiote des légumineuses [2]. Lors processus symbiotique, *R. meliloti* se fixe aux racines des légumineuses et permet la formation de nodules. A l'intérieur des nodules, elle va fixer l'azote atmosphérique et le transmettre aux légumineuses [3]. Tout comme *Brucella*, *R. meliloti* interagit donc avec des cellules eucaryotes. Le succinoglycan est un exopolysaccharide produit par *Rhizobium* lors du processus symbiotique. Il est composé de sous-unités octasaccharidiques. L'établissement d'une symbiose effective nécessite la présence de succinoglycan à faible poids moléculaire, autrement dit des monomères, des dimères et des trimères de sous-unités octasaccharidiques. La polymérisation de ces différentes formes de succinoglycan dépend notamment d'*exoT* [4]. Le rôle d'*exoO* n'est pas clairement définis à ce jour mais il fait partie de la même unité transcriptionnelle qu'*exoP* qui a été largement étudié et qui est un régulateur de la biosynthèse d'exopolysaccharide [5].

Chez les bactéries à Gram négatif, les polysaccharides de surfaces sont les lipopolysaccharides, les polysaccharides capsulaires et les exopolysaccharides (. Jusqu'à présent, il n'y a encore aucune preuve de l'existence d'exopolysaccharide chez *Brucella*. Les polysaccharides connus jusqu'à ce jour sont présent dans toutes les espèces du genre *Brucella* y compris *B. abortus*. L'ORF BMEII0838 pourrait donc jouer un rôle dans la polymérisation d'unités saccharidiques déjà existantes ou encore non identifiées.

Les résultats obtenus pour les autres ORFs, BMEII0833, 0846, 0847, 0851 montrent que ces ORFs ne sont pas exprimées en milieu riche. Sur base des homologues, BMEII0833 coderait pour une protéine hypothétique. Par contre, les autres ORFs présentent des homologies pour des gènes impliqués dans la biosynthèse d'exopolysaccharide. En effet, BMEII0846 et BMEII0847 sont des glycosyl transferases présentent respectivement chez *Erwinia amylovora* et *Escherichia coli* et impliquées dans la biosynthèse d'exopolysaccharide [6, 7].

Pour expliquer l'absence d'expression plusieurs hypothèses peuvent-être avancées■

- Soit les ORFs de ce locus sont cryptiques.
- Soit la condition testée ne constituent pas une condition d'expression.

En effet, il a été montré que la production d'exopolysaccharide est au moins en partie régulée chez d'autres bactéries[8]. C'est le cas par exemple de la production du second polysaccharide produit par *R. meliloti* qui est fonction du Quorum-Sensing [8]. Ce système permet aux bactéries de réguler l'expression de gènes de manière dépendante de la densité de population.

La production d'EPS chez *S. meliloti* peut également être contrôlée par la réponse de stringence en effet des molécules effectrices de la réponse de stringence (les ppGpp) contrôlent la production de succinoglycan [9]. La pauvreté en nutriment est aussi un stimulateur de l'expression de facteurs de virulence chez *B. melitensis*. En effet des données récentes suggèrent que l'environnement intracellulaire de *Brucella* est pauvre en nutriment (S. Kohler, communication personnelle).

Il existe chez *B. melitensis* un système de quorum-sensing (reference). Nous avons analysé l'expression des ORFs chez *B. melitensis* en phase exponentielle. Or ces ORFs ne sont peut-être pas exprimées dans cette phase de croissance. En perspective, il serait donc intéressant d'évaluer l'expression à d'autres moments de la phase de croissance.

Cependant avant d'essayer d'identifier un stimulus inducteur de leur expression, on a créé des mutants et analysé leur virulence en macrophage ovins afin d'évaluer indirectement leur expression (voir ci-dessous).

IV.2 Analyse des mutants en infection cellulaire.

Des mutants intégratifs ont été créés pour les ORFs BMEII0831, 0845, 0846, 0851 et leur virulence a été analysée en macrophages ovins. En effet, la survie intracellulaire en macrophage est la clé de la virulence pour *B. melitensis* [10]. Pour les 4 mutants, aucun effet de la mutation n'a été observé sur la virulence en macrophage ovins. On ne peut donc rien dire quant à leur expression puisque nous ne pouvons pas exclure ces ORFs ne soient pas exprimées après 48h d'infection..

En effet des mutants pour les gènes flagellaires de *B. melitensis* ne sont atténués ni en macrophages ni en cellules HeLa (Nijskens C., thèse en cours). Pourtant le promoteur de *fliF* (gène qui code pour le MS ring du flagelle) est induit après 48h d'infection dans les macrophages (Nijskens C., thèse en cours). Ces mutants sont toutefois atténués en modèle murin.

En conclusion du travail, il a été montré que l'ORF BMEII0838 n'est pas cryptique. Par contre, l'expression des ORFs BMEII0833, 0846, 0847, 0851 n'a pas pu être montrée.

En perspectives, il faudrait analyser dans les mêmes conditions l'expression des autres ORFs du tableau II.1. Mais également analyser leur virulence dans le modèle cellulaire HeLa ainsi qu'en modèle murin. Dans le cas d'une perte de virulence dans l'un des 3 modèles, essayer de déterminer le stimulus inducteur de l'expression de cette ORF.

V. Matériel et méthodes.

V.1. Souches bactériennes et plasmides.

V.1.1. E. coli S17-1 π pir.

La souche d'*E. coli* S17-1 π pir (thi pro recAhsdR RP4-2-tet::Mu aphA::Tn7) possède le plasmide RP4 intégré dans son chromosome bactérien, qui encode différentes protéines indispensables au transfert d'ADN vers une bactérie receveuse. Cette souche est notamment utilisée pour le transfert conjugatif d'ADN plasmidique chez *Brucella*.

V.1.2. E. coli DH10B.

Le génotype de la souche *E. coli* DH10B est: F⁻ *mcrA* π (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) π 80*dlacZ* π M15 π *lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 π (*ara, leu*)7697 *galU galK* π *rpsL nupG*. Cette souche est utilisée pour la transformation de divers plasmides et produits de ligation. Elle permet le test blanc/bleu. En effet, les éléments génétiques portés par cette souche (*lacZ* π M15 π *lacX74*) ne lui permettent pas d'avoir une activité β -galactosidase normale. Une complémentation intragénique avec un plasmide apportant LacZ' (fragment non opérationnel du gène de régulation de l'opéron lactose) et un fragment du gène *lacZ* (partie N-terminale de la β -galactosidase) peut néanmoins se faire. Lorsque cette complémentation est effectuée, la bactérie possède une β -galactosidase fonctionnelle. Celle-ci est mise en évidence par son action sur X-gal (20g/ml), substrat chromogène qui donne un composé bleu lorsqu'il est clivé. Afin de promouvoir l'activité du promoteur de *lacZ*, le milieu est additionné d'IPTG (0,1mM). Les bactéries présentant un plasmide contenant un insert apparaîtront blanche sur ce milieu puisque l'insert a disrupté le gène *lacZ'* et la β -galactosidase n'est donc plus produite.*

V.1.3. B. melitensis 16M (Nal^R).

La souche de référence utilisée tout au long de ce travail est *B. melitensis* 16M biovar 1 Cette souche est de phénotype lisse et résistante à l'acide nalidixique (Nal^R). Cette souche a été reçue de A. MacMillan.

V.1.4. pSKoriTKan (Fig. V.1).

Ce plasmide est un dérivé de pBluescript SK(-) dans lequel une origine de transfert conjugatif oriT a été clonée (Anne Tibor *et al.*). Il porte une origine de réplication ColE1 non fonctionnelle chez *Brucella*, c'est donc un plasmide non réplcatif chez cette bactérie. Il porte la cassette de résistance à la kanamycine disruptant le gène *bla* qui encode la résistance à l'ampicilline (V. Haine, mémoire de licence 2000).

V.2. Milieux de culture.

V.2.1. Milieu de Luria Bertani (LB).

a) Forme liquide

- | | |
|------------------------------------|-----------------|
| - Hydrolysate de caséine (peptone) | - Yeast extract |
| - NaCl | 1 g/ 100ml |

0.5 g/ 100ml

0.5g/100ml

b) Forme solide

- Hydrolysate de caséine (peptone)	1 g/ 100ml
- NaCl	0.5 g/ 100ml
- Yeast extract	0.5 g/ 100ml
- Agar	1.2 g/ 100ml

V.2.2. Milieu 2YT.

a) Forme liquide

- Mélange pour LB liquide	2 g/ 100ml
- Hydrolysate de caséine (peptone)	0.6 g/ 100ml
- Yeast extract	0.5 g/ 100ml

b) Forme solide

- Mélange pour LB agar	3.2 g/ 100ml
- Hydrolysate de caséine (peptone)	0.6 g/ 100ml
- Yeast extract	0.5 g/ 100ml
- Agar	0.1 g/ 100ml

V.2.3. Antibiotiques.

- Kanamycine (Kan 50)	50 µg/ ml
- Acide nalidixique (Nal 25)	25 µg/ ml

V.3. Méthodes relatives à l'ADN.

V.3.1. Electrophorèse sur gel d'agarose

Cette méthode de séparation des fragments d'ADN permet l'évaluation de la taille et de la quantité de ces fragments. En effet la distance de migration est inversement proportionnelle à la taille du fragment. Les groupements phosphates de l'ADN (ou ARN) lui confère une charge globale négative. Dès lors, l'ADN migre vers l'électrode positive dans un champ électrique. La taille des fragments est quant à elle estimée en faisant co-migrer un marqueur composé de fragments d'ADN de tailles connues. La visualisation des fragments est permise grâce au bromure d'éthidium. Celui-ci se lie à l'ADN bicaténaire en s'intercalant entre les bases de la double hélice. Sous U.V (ultra-violet), la molécule devient fluorescente et marque donc l'ADN. L'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la quantité mais également à la taille de l'ADN présent. Dès lors par comparaison de l'intensité du fragment avec l'intensité du marqueur, il est possible de déterminer la quantité d'ADN. La vitesse de migration des acides nucléiques dépend de plusieurs paramètres:

1° Le voltage. A faible voltage, la vitesse de migration est linéaire et proportionnelle au voltage appliqué. A partir d'une certaine limite de voltage , la résolution diminue.

2° La concentration en agarose. La concentration varie de 0,8 à 2%. En fonction de celle-ci, il est possible de séparer des fragments de petites tailles avec de grandes concentrations, et de grandes tailles pour les faibles concentrations.

3° Le poids moléculaire des fragments d'ADN. La vitesse est inversement proportionnelle à leurs poids moléculaires.

4° La conformation de l'ADN. Les formes plasmidiques super enroulées ou CCC (Completely Closed Circular), formes nickées sur un seul brin ou OC (Open Circular) et OL (Open Linear) migrent à des vitesses différentes. L'ordre de migration sera $CCC > OL > OC$

Réactifs

- Tampon d'électrophorèse TAE (50X concentré):

Tris	40 mM
EDTA	1 mM
Acide acétique glacial	40mM
- Porter à pH 8
- Alourdisseur 10X concentré, pour 10 ml :

Bleu de bromophénol	25 mg
Glycérol	5 ml
EDTA (1M)	0,5ml
- Solution de bromure d'éthidium:

10 mg/ ml, maintenir à l'abri de la lumière.
--

Méthode:

Au cours de ce travail, nous avons utilisé des gels d'agarose 1,2%.

- Dissoudre 1,2g d'agarose (Invitrogen) dans 100 ml de TAE 1X.
- Porter à ébullition jusqu'à ce que la solution soit limpide, laisser ensuite refroidir jusqu'à une température de 50°C. Le gel encore liquide à cette température est coulé dans un moule.
- Ajouter du bromure d'éthidium à une concentration finale de 0,5 mg / ml.
- Placer un peigne comportant le nombre adéquat de dents, celui-ci permettra après solidification de former des puits dans lesquels seront déposés les échantillons.
- Une fois solidifié, retirer les peignes et placer le gel dans la cuve d'électrophorèse.
- Introduire dans un des puits l'échantillon d'ADN ou d'ARN alourdi par l'ajout de 1/10 du volume final de solution d'alourdisseur à la micropipette.
- Appliquer une différence de potentiel d'environ 120 volts aux extrémités de la cuve pendant 1h. Le bleu de bromophénol, qui migre à la même vitesse que les plus petits fragments visibles, permet de contrôler la migration.
- Après migration, le gel est placé sur un transilluminateur UV permettant de visualiser les bandes acides nucléiques.

V.3.2. Constructions plasmidiques.

Pour lier de manière covalente deux fragments d'ADN, on utilise l'ADN ligase du phage T4 (Invitrogen, 1U/ μ l). Elle catalyse la formation de liens phosphodiester entre l'hydroxyl 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' d'une extrémité proche. L'enzyme, pour être active, nécessite la présence d'ATP et d'ions Mg^{2+} . Au cours de ce travail, des clonages de fragment à bout francs ont été réalisés au site *EcoRV* du plasmide psKoriTKan.

Méthodes

- Mélanger dans un tube Eppendorf les fragments d'ADN à liguer dans un rapport de 3 inserts pour 1 matrice.
- 1 μ l du volume final de tampon de ligation 10X.
- 1 μ l de DNA ligase
- Compléter avec de l'eau distillée stérile pour obtenir un volume final de 10 μ l.
- Incuber, à température ambiante 2-3 heures
- Transformation de 5 μ l du mélange de ligation dans des *E. coli* DH10B $CaCl_2$ compétentes.

V.3.3. Transformation bactérienne.

La transformation bactérienne est un mécanisme par lequel une cellule assimile du matériel génétique externe. Ce processus n'est possible que si la paroi et la membrane bactériennes sont rendues perméables, la cellule est alors dite *compétente*. Afin de rendre les *E. coli* DH10B compétentes, les bactéries sont soumises à une succession de lavages avec des solutions froides de chlorure de calcium (CaCl_2) permettant de fragiliser la paroi et la membrane de la bactérie. L'ADN à transformer est ensuite introduit dans les bactéries compétentes par un choc thermique. Après un tel traitement, la cellule est placée dans un milieu riche pendant au moins 30 minutes à 37°C permettant une régénération de sa paroi ainsi que le commencement d'expression du transgène. Enfin, les bactéries sont étalées sur un milieu sélectif où seules les bactéries transformées, c'est-à-dire ayant reçu le plasmide porteur d'un gène de résistance à un antibiotique, pourront croître. Dès lors les clones cellulaires bactériens correspondent à des clones moléculaires du plasmide.

Méthode:

Prendre 100 µl de cellules compétentes (dégelées sur glace):

- Ajouter le produit de ligation ou le plasmide à transformer aux cellules et incubé 30 minutes sur glace afin de favoriser l'adsorption de l'ADN sur la paroi bactérienne.
- Placer le mélange 2 minutes à 37°C (choc thermique).
- Ajouter 500 µl de LB liquide au mélange (étape de régénération).
- Etaler 200 µl des bactéries ainsi traitées sur un milieu solide additionné des antibiotiques correspondant à la cassette de résistance porté par le plasmide transformé et incubé une nuit à 37°C.

V.3.4. Minipréparation d'ADN plasmidique.

Une minipréparation comprend 5 étapes : la lyse alcaline des bactéries, la précipitation des protéines et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique, le lavage de l'ADN plasmidique et sa resuspension.

Réactifs

- P1: - RNase A 100 µg/ ml
 - Tris-HCL 50 mM pH 8,0
 - EDTA 10mM, à conserver à 4 °C
- P2: - NaOH 200 mM
 - SDS 1 %, à conserver à température ambiante
- P3: - KAc 3.0 M pH 5.5, à conserver à 4°C

Méthode

- Ensemencer 5 ml de milieu liquide (LB + antibiotiques) avec une colonie isolée.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation.
- Centrifuger 1,5 ml de la culture dans un eppendorf (pendant 5 minutes à 12500 rpm) et éliminer le milieu de culture.
- ■ Resuspendre le culot bactérien avec 300 µl de tampon P1.
- Ajouter 300 µl de tampon P2, mélanger par retournement et incubé 5' à température ambiante (étape de lyse)
- Ajouter 300 µl de tampon P3, mélanger par retournement et incubé 10' sur glace (étape de précipitation)
- Centrifuger 20' à 14000 rpm , 4°C.
- Récupérer le surnageant.
- Ajouter 0,7 volume d'isopropanol afin de précipiter l'ADN plasmidique, mélanger au vortex.
- Centifuger 15' à 12500 rpm, 4°C.

- Eliminer le surnageant.
- Ajouter 300 µl d'éthanol 70% pour éliminer les sels du culot d'ADN.
- Centrifuger 5' à 12500 rpm, 4°C.
- Enlever le surnageant au tips.
- Sécher 5' au speed vac.
- Resuspendre dans 20 µl d'eau stérile.

V.3.5. Restriction d'ADN.

Le clivage de l'ADN bicaténaire à des sites précis se fait par des endonucléases de restriction qui reconnaissent de courtes séquences, souvent palindromiques, de 4 à 6 paires de bases.

Méthode

- x µl d'ADN à restreindre en suspension dans de l'eau distillée.
- Ajouter 2 µl de tampon de restriction 10X, associé à l'enzyme.
- Ajouter 1 µl d'enzyme de restriction pour les restrictions diagnostiques des plasmides et 2 µl d'enzyme concentrée pour les restrictions d'ADNg.
- Amener au volume final de 20 µl ou de 60 µl avec de l'eau distillée suivant que ce soit la restriction d'un plasmide ou de l'ADNg, respectivement.
- Incuber le mélange au minimum 1 heure 30' (pour l'ADN plasmidique) ou toute la nuit (o/n) (pour l'ADNg) à la température optimale pour l'enzyme (souvent 37°C).

V.3.6. Amplification PCR.

L'ADN doit être dénaturé pour permettre l'hybridation des amorces. Des amorces oligonucléotidiques complémentaires de séquences se trouvant de chaque côté de la région cible, s'hybrident l'une au brin "sens" et l'autre au brin "anti-sens".

Une ADN polymérase thermostable telle que la Taq (Biotools) qui ajoute une base A aux extrémités 3' est alors utilisée pour synthétiser à partir de l'extrémité 3'-OH de chaque amorce un brin d'ADN complémentaire. Afin de produire des amplicons qui puissent être clonés en *EcoRV* du pSKoriTKan, une seconde PCR a été réalisée en utilisant la *Pfx* (Gibco/BRL) qui est une enzyme ne modifiant pas les extrémités des fragments qu'elle amplifie. La *Pfx* n'est pas utilisée en premier car, en générale, elle ne fonctionne pas sur l'ADN génomique de *B. melitensis* 16M.

Un cycle d'amplification PCR comprend 3 étapes : dénaturation des brins d'ADN, hybridation des amorces et élongation (synthèse d'un brin d'ADN complémentaire). En répétant ce cycle, on augmente de façon exponentielle le nombre de copies du fragment cible.

Le T_m (température d'hybridation) se calcule de la façon suivante : $T_m = 4x(G+C) + 2x(A+T)$ (4°C sont comptabilisés pour les bases G et C et 2°C pour les bases A et T).

Les oligonucléotides utilisés au cours de ce travail sont repris dans le tableau V.I.

Méthode

Prendre 10 µl de l'ADN génomique pour la PCR:

- Ajouter :
 - 1) 5 µl de tampon biotools 10X
 - 2) 2 µl de dNTPs 5µM
 - 3) 2 µl d'une solution d'oligonucléotides forward et reverse à 20µM
 - 4) 0,5 µl de DNA polymérase (Biotools) (en dernière minute)
- Compléter avec de l'eau pour arriver à un volume final de 50 µl.

Le cycle se fait comme suit:

- 1) 94°C pendant 5' □ dénaturation de l'ADN .
- 2) 35 cycles : 94°C pendant 30''

- 3) 55°C pendant 30'' □ hybridation des amorces
- 4) 74°C pendant 30'' □ élongation
- 5) Retourner 30 fois à l'étape 2
- 6) 74°C pendant 10'' □ élongation finale

Après la PCR, les fragments d'ADN obtenus sont purifiés à l'aide du kit de purification **Rapid PCR purification system** de GibcoBRL.

Détermination de la quantité du produit PCR:

La comparaison sur gel de l'intensité de l'amplicon et du marqueur de taille (Bioline) permet de déterminer la concentration du produit PCR déposé. En effet, pour le marqueur de taille, une concentration est assignée pour les différentes bandes observées. Il faut également tenir compte du volume du produit PCR ainsi que du marqueur de taille déposé sur gel.

V.3.7. Conjugaison bactérienne.

La conjugaison entre bactéries Gram négatives est un transfert latéral de matériel génétique. La bactérie donneuse exerce un transfert vers une bactérie receveuse. La conjugaison est rendue possible grâce à la formation d'un pilus sexuel par la bactérie donneuse également appelée bactérie mâle ou F+.

Méthode:

Lancer 2 précultures: Ensemencer, d'une part, 5ml de LB liquide avec des *E.coli* S17 □pir donneuse contenant le plasmide d'intérêt avec l'antibiotique approprié. D'autre part, ensemencer 100 ml de 2 YT liquide avec des *Brucella* receveuse (Nal^R) ensuite agitation o/n à 37°C:

- Prendre 1 ml de la préculture auquel on ajoute 10 ml de LB Kan, agitation à 37°C pendant 4h.
- Avant la conjugaison, centrifuger la culture de *E.coli* pendant 15' à 3000 rpm afin de culoter les cellules. Eliminer le surnageant et laver 2 fois avec du LB liquide afin d'éliminer les antibiotiques.
- Resuspendre le culot dans un volume final de 1 ml de LB.
- Les cultures de *Brucella* sont centrifugées 20' à 3000 rpm. Le culot est resuspendu dans 1 ml de 2 YT.
- Transférer des filtres 0,22 µm, autoclaver au préalable, sur des boîtes LB très sèches.
- Mélanger 50µl d'*E. coli* à 50µl de *B. melitensis* 16M sur le filtre.
- Incuber 1h à 37°C.
- Transférer ensuite le filtre dans de petites boîtes rondes et ajouter 800 µl de 2 YT afin de resuspendre les bactéries.
- Répartir les 800 µl sur 3 boîtes 2 YT NalKan. L'acide nalidixique va permettre de sélectionner les *B. melitensis* et d'éliminer les *E.coli* qui y sont sensibles. La Kanamycine permettra de sélectionner les clones de *B. melitensis* candidats intégratifs.
- Incuber 4 jours à 37°C.

Contrôles:

Les bactéries donneuses *E.coli* S17 □pir sont étalées sur un milieu additionné d'acide nalidixique et les *Brucella* receveuse sur un milieu contenant la kanamycine afin de vérifier qu'aucune de 2 souches ne résistent à ces antibiotiques avant conjugaison.

V.3.8. Extraction d'ADN génomique de *Brucella* sp.

Réactifs

-TENa:

- | | |
|---------|--------------|
| 1) Tris | 50 mM à pH 8 |
| 2) EDTA | 50 mM |
| 3) NaCl | 0.1 M |

-Protéinase K 20 mg/ml

- | | |
|----------------------|-----------------------|
| 1) Tris pH 7.5 | 1 mM |
| 2) CaCl ₂ | 1 mM (conservé à 4°C) |

-Phénol saturé en TENa

- 1) un volume de TENa
- 2) un volume de phénol

Méthode

Soit à partir d'une culture liquide

- Prélever 1,5 ml, centrifuger et éliminer le surnageant (Jouan).

Soit à partir d'une culture solide

- Prélever des bactéries sur milieu solide avec une anse.
- Resuspendre le culot bactérien dans 567 µl de TENa.
- Ajouter 30 µl de SDS 10 % et 3 µl de protéinase K (20mg/ml).
- Homogénéiser en inversant doucement l'éppendorf et incubé à 37°C pendant 1h.
- Ajouter 600 µl de phénol saturé en tampon TENa et agiter fortement.
- Centrifuger 20' à 13500 rpm, à 4°C.
- Récupérer la phase aqueuse sans emporter le voile à l'interface.
- Ajouter 80 µl de NaClO₄ 5M et 600 µl de chloroforme, agiter fortement.
- Centrifuger 10' à 13500 rpm, à 4°C.
- Récupérer la phase aqueuse et ajouter 1 ml d'éthanol 100%.
- Mélanger en inversant.
- Centrifuger 20' à 13500 rpm à 4°C.
- Éliminer le surnageant et ajouter 1 ml d'éthanol 70%.
- Centrifuger 10' à 13500 rpm, à 4°C.
- Éliminer le surnageant et sécher sous vide.
- Resuspendre dans 100 µl d'eau distillée stérile.

Rmq pour faciliter la resuspension, incubé l'éppendorf à 37°C.

V.3.9. Southern blotting.

Le Southern blot est une technique d'identification et de localisation de séquences spécifiques d'ADN. Elle tire parti de la propriété qu'a l'ADN de former des structures en duplex stables, stabilité en relation directe avec la complémentarité des deux brins d'ADN. Le procédé utilise des sondes d'ADN radiomarquées qui vont s'hybrider avec les séquences d'intérêts.

Dans cette méthode, l'ADN est digéré par une enzyme de restriction et les fragments d'ADN bicaténaire sont séparés par une électrophorèse sur gel d'agarose de façon à séparer les fragments selon leur taille. Les fragments d'ADN sont visualisés grâce aux UV et dénaturés par incubation du gel dans une solution de dénaturation d'hydroxide de sodium. Le gel est ensuite immergé dans un bain de neutralisation. Les fragments d'ADN sont transférés sur une membrane de nylon dans une solution de haute concentration alcaline grâce à un transfert effectué par capillarité, on obtient donc une réplique du gel sur le film. L'ADN est ensuite fixé de manière covalente à la membrane de nylon par chaleur et par exposition aux UV.

L'hybridation de la sonde d'acide nucléique radiomarquée à l'ADN dénaturé et restreint fixé sur la membrane de nylon s'effectue dans des conditions de stringence données, après élimination par lavage de l'excès de sonde non fixée à la membrane.

La sonde hybridée au fragment d'ADN recherché est détectée par autoradiographie de la membrane. La position à laquelle s'est effectué l'hybridation spécifique de la sonde est donnée par un marqueur de taille moléculaire.

V.3.9.1. Restriction de l'ADN génomique.

Les préparations d'ADN génomique sont complètement restreintes par une endonucléase de restriction appropriée. Les enzymes utilisées dans notre travail sont *Hind*III (40 U/ μ l), *Eco*RI (40 U/ μ l) (Roche).

Méthodes

- Prendre 30 μ l d'ADN génomique resuspendu dans de l'eau distillée.
- Ajouter 2 μ l d'enzyme concentrée (*Hind*III et *Eco*RI).
- Ajouter 6 μ l de tampon de restriction 10X associé à l'enzyme.
- Incuber une nuit à 37 °C.

V.3.9.2. Electrophorèse sur gel d'agarose.

La séparation des fragments d'ADN restreints est réalisée dans un gel d'agarose de 0,8 %. Le marqueur de taille HyperLadder (Bioline) et lambda *Hind*III sont utilisés pour évaluer la taille des fragments de restriction.

V.3.9.3. Transfert et immobilisation.

Après avoir séparé les fragments d'ADN sur gel d'agarose, on transfère les acides nucléiques sur une membrane de nylon.

Réactifs

- Solution de dénaturation

NaCl	1 M
NaOH	0.5 M
- Solution de neutralisation

NaCl	1.5 M
Tris HCl	0.5 M pH 7.2
EDTA	1 mM
- SSC 20X

NaCl	3 M
Na ₃ citrate	0.3 M

Méthodes

- Placer le gel dans un récipient avec de la solution de dénaturation, pendant 20' à faible agitation.
- Remplacer la solution de dénaturation par de la solution de neutralisation, 20' à faible agitation.
- Transfert sur membrane, placer le gel sur un papier Whatman dont les extrémités baignent dans du SSC 20X. Au dessus du gel vient se mettre la membrane de nylon. Recouvrir avec 3 morceaux de papier Whatman ainsi que des feuilles de papier absorbants, le tout surmonter d'un poids pour faire pression.
- Laisser transférer o/n.

V.3.9.4. Préhybridation.

La membrane est immergée dans une solution de préhybridation pendant 30' à 65°C. Ceci permet de réduire le bruit de fond en hybridant de manière non-spécifique la membrane avec de l'ADN non marqué de thymus de veau.

Réactifs

- Denhard 50X	5 ml
- SSc 20X	12,5 ml
- SDS 10%	0,5 ml
- ADN de thymus de veau 100 µg/ml	3,3ml
- H ₂ O	28,7 ml

Méthodes

- Stocker la membrane de nylon entre 2 papiers Whatman et faire sécher à l'étuve pendant 1h.
- Fixer la membrane sous U.V pendant 1 minute.
- Mettre la membrane dans la solution de préhybridation et laisser sous agitation pendant au moins 30'.

V.3.9.5. Marquage de la sonde et hybridation.

Le fragment d'ADN utilisé comme sonde est dénaturé et mis en présence de primers aléatoires. Une synthèse d'ADN est initiée par la polymérase Klenow, en incorporant des nucléotides dont le dCTP est marqué radiativement au P₃₂.

La sonde est réalisée en utilisant le kit Rad prime label system de Invitogen et les γ -³²P dCTP (10 mCi/ ml, 3000 Ci/ mmol) de Amersham Pharmacia Biotech.

Méthodes

- Porter environ 25 µg d'ADN sonde à un volume finale de 10 µl avec de l'eau stérile.
- Faire bouillir pendant 5', faire un quick spin et ensuite conserver sur glace.
- Ajouter 1 µl de dATP, dGTP, dTTP et 20 µl de random primers (solution 2.5X).
- Ajouter 5 µl de dCTP marqué au ³²P et ajouter 11 µl d'H₂O₂, mélanger.
- Ajouter 1 µl de klenow et faire un quick spin.
- Incuber 10' à 37 °C.

La membrane est incubée avec la sonde dans la solution de préhybridation, pendant une nuit, à 65 °C.

V.3.9.6. Détection et révélation.

- Récupérer la sonde radioactive et la mettre à - 20°C.
- Recouvrir la membrane avec la solution de SSC 2X, SDS 0,1% et répéter l'étape jusqu'à ce que la radioactivité soit inférieure à 10000 cpm.
- Mettre dans une farde en plastique et la coller dans une cassette.
- Placer par dessus un film radiographique.
- 6h à - 80°C.
- Sortir la cassette 10' avant de révéler dans les bains.

V.4. Méthodes relatives à l'ARN

Pour de l'ARN, il est indispensable de travailler en conditions RNase free. Cela signifie que toutes les solutions doivent-être préparées avec de l'eau traitée au DEPC 0,1% (diéthyl

pyrocarbonate). Le port de gant est obligatoire. Il faut nettoyer systématiquement la surface de travail, les pipettes et les centrifugations avec de l'H₂O₂ 3% ou du SDS 2%.

V.4.1. Préparation d'ARN.

V.4.1.1. Culture de *B. melitensis* 16M.

Lancer une préculture liquide (10 ml 2YT) à partir d'une boîte de culture de *Brucella melitensis* 16M. Laisser sous agitation pendant 24h à 37°C.

Le lendemain au soir: lancer une culture de 100ml de 2YT avec 1ml de la préculture sous agitation, o/n à 37°C. On attend une DO de 0,4 à 600nm (moins de 10⁹ bactéries).

Rmq: cette étape est très importante! Les bactéries doivent impérativement être en croissance **exponentielle**.

Conseil: la première fois surveiller la DO, lancer éventuellement la culture en début de journée et culoter les cellules, les laver (voir plus loin) et stocker à -80°C.

V.4.1.2. Lavage et lyse.

Réactifs

- TE stock:
 - 1) Tris 1M
 - 2) EDTA 0,5M
- TE final:
 - 1) Tris 10m
 - 2) EDTA 1mM
- Protéinase K (20mg/ml)
- SDS 10%

Méthodes

Lavage

- Culoter les cellules en falcon de 50 ml, 20' à 2500 rpm.
- Resuspendre dans 1/10 volume de TE (Tris EDTA).
- Rmq: Préparer le TE au jour le jour.
- Centrifuger 15' à 2500 rpm (Jouan).
- Resuspendre le culot dans 3,6 ml de TE à l'aide d'une pipette Pasteur en plastique, stérile. Passer dans les falcons de 15 ml.
- Lyse au SDS et protéinase K:
 - Ajouter 40 µl de protéinase K (20mg/ml) et 400 µl de SDS 10% au 3,6 ml de cellules resuspendues dans le TE.
 - Agiter par retournement laisser au minimum 1h à 37°C.

Si la lyse a bien fonctionné, on doit avoir une solution transparente et non gelatineuse.

Rmq: la préparation d'ARN semble meilleure en laissant 1h à 37°C plutôt que toute la nuit.

V.4.1.3. Extraction d'ARN.

L'extraction d'ARN bactérien a été réalisée à l'aide du kit "RNeasy Midi" (Qiagen). Le protocole décrit ci-dessous a été mis au point pour *Brucella*.

Méthodes

On travaille à RT sauf après passage sur colonne où on travaille sur glace.

Prendre le lysat bactérien:

- Ajouter 8 ml de buffer RLT, vortexer pendant 10''.

Rmq: ajouter du β -mercaptoéthanol au buffer RLT avant utilisation (10 μ l par ml de RLT).

- Centrifuger 15' à 3000 rpm (Jouan) et récupérer prudemment le surnageant.
 - Répéter une seconde fois cette étape de centrifugation.
 - Ajouter 5,6 ml d'éthanol, vortexer afin de faire précipiter l'ADN génomique (ADNg) qui devient visible. Ne pas centrifuger.
 - Verser le contenu sur la colonne QUIAGEN en essayant dans la mesure du possible, de ne pas mettre l'ADN génomique.
- Souvent, le volume dépasse la capacité de la colonne. Dans ce cas, charger la colonne 2 ou 3 fois de suite.
- Centrifuger 10' à 3000 rpm.
 - Ajouter 3,8 ml de buffer RW1 à la colonne et centrifuger 10' à 3000 rpm.
 - Eliminer les déchets.
 - Ajouter 2,5 ml de buffer RPE à la colonne et centrifuger 5' à 3000 rpm (lavage).
 - Second lavage: ajouter 2,5 ml de buffer RPE à la colonne et centrifuger 15 min à 3000 rpm. Ce tampon contient de l'éthanol, il ne doit pas en rester une goutte dans le fond de la colonne.
 - Centrifuger à sec une 3^{ème} fois pour éliminer tout l'éthanol.

Elution: transférer la colonne dans un tube propre fourni dans le kit. Appliquer sur la colonne (juste au dessus!) 200 μ l d'H₂O DEPC (fourni dans le kit), laisser 1 min et centrifuger 5 min à 3000 rpm. Répéter cette manipulation une 2^{ème} fois. On obtient une préparation d'ARN total (ARNt) de 400 μ l. Stocker à - 80°C.

V.4.1.4. Evaluation de la qualité des échantillons d'ARN bactérien.

La qualité de l'échantillon d'ARNt été évaluée par la mesure successive de la densité optique (D.O) de l'échantillon à une longueur d'onde de 260 nm (pour doser les acides ribonucléiques) et à une longueur d'onde de 280 nm (pour doser les protéines).

Méthodes

Prendre 1 μ l de l'échantillon d'ARNt.

- Ajouter 49 μ l d'eau DEPC, homogénéiser.
- Placer 50 μ l d'eau DEPC dans une cuvette en quartz lavée au préalable avec du SDS 2%.
- Mettre à 0 le spectrophotomètre.
- Placer 50 μ l de l'échantillon d'ARNt dilué dans la cuvette en quartz lavée au préalable avec de l'eau DEPC.
- Noter l'absorbance aux longueurs d'onde 260 et 280 nm.

Remarque: il faut bien nettoyer la cuvette entre chaque mesure.

Si le rapport entre le dosage des acides ribonucléiques sur le dosage des protéines est supérieur à 2 l'échantillon est considéré comme de bonne qualité.

Pour estimer la quantité d'ARNt présente dans l'échantillon, il faut appliquer la formule ci-dessous:

1 unité à 260 nm = 40 μ g d'ARN total /ml d'eau.

V.4.1.5. Elimination de l'ADN génomique, traitement à la Dnase.

Réactifs

- 10X DNase I buffer
- DNase
- Réactif de neutralisation de la DNase

Méthodes

Prendre 100 µl d'extrait d'ARNt.

- Ajouter 0,1 volume de 10X DNase I buffer et 1 µl de DNase.
 - Vortexer et incuber à 37°C pendant 20 à 30'
 - Vortexer le réactif de neutralisation de la DNase pour bien le resuspendre.
 - Ajouter 0,1 volume du réactif de neutralisation à la solution d'ARNt et vortexer.
 - Incuber 2' à RT.
 - Centrifuger le tube à 10000 rpm pendant 1' et récupérer le surnageant (Eppendorf).
- On récupère un volume d'ARNt de 100 µl dans laquelle l'ADNg a été éliminé.

V.4.2. RT-PCR sur ARN traité à la DNase

Cette technique est la plus sensible pour la détection d'ARNm. Elle est composée de 2 parties: 1°) Synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) du brin d'ARNm (reverse transcription).

L'ADN obtenu est appelé de l'ADN complémentaire.

2°) Amplification de ce même brin d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

La reverse transcription se fait à l'aide d'une enzyme, la Superscript II RNase H, du brin d'ARNm à partir d'une amorce d'ADN. L'extension se fait à partir de l'extrémité 3' OH de l'amorce par ajout de nucléotides complémentaires à la matrice d'ARNm.

La réaction de polymérisation en chaîne permet d'amplifier rapidement (un grand nombre de fois) l'ADNc. On incube l'ADN dans des conditions appropriées en présence de l'ADN polymérase et des amorces. Cette amorce va s'hybrider à l'ADN et sera allongée à son extrémité 3' OH libre par ajout de nucléotides complémentaires au brin matrice. Par alternance de cycle de dénaturation, d'hybridation, de polymérisation, le nombre de doubles brins augmente de manière exponentielle.

V.4.2.1. Reverse transcription (RT)

Réactifs

- RNase out inhibitor (Invitrogen)
- Eau DEPC
- DTT (dithiothréol) 0,1M (Invitrogen)
- Superscript II buffer 5X (Invitrogen)
- Superscript (Invitrogen)
- dNTP (5 µM)

Méthodes

Prendre 10 µl d'ARNt traité par la DNase:

- Ajouter 4 µl de RNase out inhibitor, 1 µl d'oligonucléotides forward spécifique de L7/L12 et 1µl d'oligonucléotides forward spécifique des ORFs d'intérêt.
- Rmq: on peut très bien ne pas ajouter d'oligonucléotides car la DNase a laissé derrière elle de petits fragments d'ADN qui pourraient servir d'amorces.
- Compléter avec de l'eau DEPC pour avoir un volume final de 20 µl.
 - Placer l'échantillon 10' à 70°C, et ensuite 1' sur glace.
 - Ajouter le mix :
 - 4 µl de DTT 0,1M
 - 6 µl de Superscript II buffer 5X(contient du MgCl₂)
 - 4 µl de dNTP 5mM
 - Bien mélanger.
 - Placer pendant 5' à 25°C si ajout d'oligonucléotides, ou 2' à 42°C si pas d'oligonucléotides.
 - Ajouter 2 µl de Superscript.

- Placer dans un appareil à PCR pour différents cycles de températures:

1) 10' à 25°C

2) 50' à 42°C □ température optimale de l'enzyme

3) 15' à 70°C □ fin de la réaction par dénaturation de l'enzyme □ obtention d'ADNc

A la fin de cette étape, nous obtenons un échantillon d'ADNc pour un volume final de 20 µl.

V.4.2.2. Amplification de l'ARN rétrotranscrit

Prendre 4 µl de la RT pour la PCR. L'étape de PCR se déroule comme décrit au point V.3.6. Différents contrôles sont réalisés:

CTL+: sur de l'ADNg avec les oligonucléotides spécifiques et les oligonucléotides spécifiques de *L7/L12*.

CTL -: sur de l'ARNt traité à la DNase (prendre 2 µl d'ARN traité à la DNase) avec les oligonucléotides spécifiques des différentes ORFs d'intérêt et de *L7/L12*.

CTL - PCR: sur de l'eau DEPC.

V.5. Infection en macrophage ovins

Les macrophages ovins sont cultivés dans du RPMI + FCS 10%. La culture est réalisée à 37°C dans des flasques F75 (Nunc) .

Pour les macrophages:

Jour -1

- Eliminer le milieu (le milieu RPMI + FCS10%).

- Rincer.

- Détacher le tapis cellulaire en ajoutant 7 ml de trypsine-EDTA diluée 3X dans du PBS stérile. Laisser agir 5 à 10' à 37°C. Utiliser la solution suivante□

- trypsine 5 g/L

- EDTA 2 g/L

- NaCl 8.5 g/L

- Stopper la réaction en ajoutant du milieu additionné de FCS.

- Centrifuger à 1000 rpm pendant 10' (JOUAN).

- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot cellulaire dans 1ml de milieu.

- Effectuer un comptage du nombre de cellules grâce à une cellule de Thoma.

- Diluer la suspension cellulaire de façon à obtenir $1,5 \cdot 10^5$ cellules /ml.

- 100 µl de cette dilution soit $1,5 \cdot 10^4$ cellules sont déposés dans chaque puits d'une plaque multipuits (96 puits, Nucleon).

Pour les bactéries:

Jour -1

- Ensemencer les souches de *Brucella* à tester dans 5 ml de 2YT, mettre à 37°C sous agitation.

Jour 0

- Déterminer le nombre de bactéries par mesure de la DO ($DO_{600nm} 1=3 \cdot 10^9$ bactéries/ml).

- Amener à une dose infectante (DI) de 300 bactéries par cellule eucaryote, soit $6 \cdot 10^7$ bactéries/ml diluées dans le milieu de culture des cellules.

- Eliminer le milieu des puits à infecter et remplacer par 100 µl de la dilution bactérienne.

- Centrifuger 10' à 1200 rpm.

- Incuber 1 heure à 37°C et 5% de CO₂.

- Laver 2 fois avec 100 µl de milieu.

- Eliminer le milieu et ajouter 200 µl de milieu + gentamycine (50 µg/ml) afin d'éliminer les bactéries extracellulaires (correspond au temps 0).
- Incuber 1 h à 37°C et 5% de CO₂.

Dénombrement des bactéries intracellulaires

- Eliminer le milieu de culture.
- Laver 2 fois avec 200 µl de PBS.
- Au temps post-infection désiré (1 ou 48 h), les cellules eucaryotes sont lysées en ajoutant 200 µl de PBS + 0,1% Triton X100 pendant 10'.
- Le lysat est dilué de 10 en 10 jusqu'à la dilution 10¹ à 10⁶ en fonction du temps p.i. 20 µl de chaque dilution est étalée sur milieu 2YT agar.
- Après 3 jours d'incubation à 37°C, les colonies sont dénombrées et correspondent au CFU («colony forming unit»). On réalise un calcul de moyenne pondérée pour quantifier le nombre de CFU/puits.

Quantification de la DI (dose infectante)

- La solution bactérienne utilisée pour l'infection est diluée de 10 en 10 et 20 µl des dilutions 10⁻³ à 10⁻⁶ sont déposés sur milieu 2YT agar (on laisse couler les gouttes sur les grandes boîtes carrées).
- Incuber à 37°C pendant 3-4 jours.
- Dénombrer les CFU.

En cas de co-infection, il faut que chacune des deux souches impliquées soit à une D.I. de 300 bactéries/cellules.

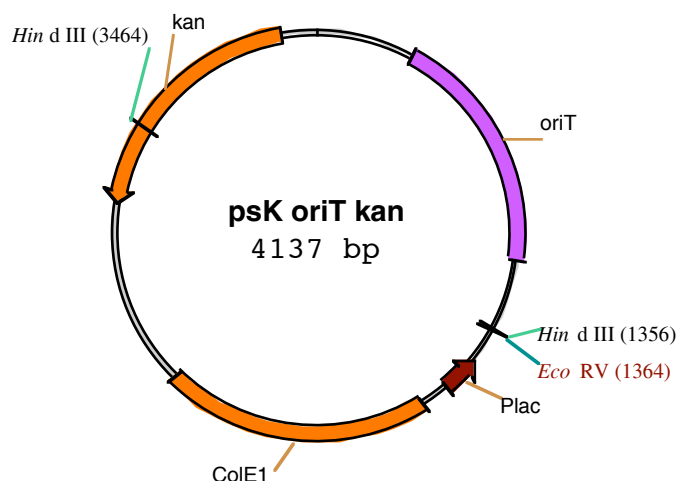


Figure V.1 : Plasmide pSKoriT Kan. : cassette encodant la résistance à la kanamycine ; ColE1 : origine de réplication (non fonctionnelle chez *Brucella*) ; oriT : origine de transfert conjugatif.

NOM DE L'OLIGONUCLEOTIDE	OLIGONUCLEOTIDES DE 5' VERS 3'	TAILLE DE L'OLIGONUCLEOTIDE	TAILLE ATTENDUE DE L'INSERT (PB)
FBMEII0831	gACTggAACgCCTCTTTATg	20	367
RBMEII0831	TCACAggAATgTTgCgTCCgTTT	23	
FBMEII0833	CAACgCCCTgCCTCTTgAT	19	284
RBMEII0833	TCAAgCCAaAAACACCgTTATg	22	
FLPSE	gCgACATCATAgATCgCATg	20	387
RLPSE	TCACAgCCgTCCgCCTTCAATC	22	
FBMEII0837	CCgTAgCgCgggAAATTg	18	271
RBMEII0837	TCACggCTgAAggggCAATTC	21	
FLPSC	CTCgACTggTgCgATgATA	19	
RLPSC	TCAgACggAgCgCTCgAAATg	21	341
FLPSB	gAggCAACggCCATgATTC	19	357
RLPSB	TCACACCTCgACTTCATTCAggT	23	
FBMEII0846	CgCAgggTATTCCgCAAgA	19	366
RBMEII0846	TCACTCgCgTgCggCAAAACT	22	
FBMEII0847	TggTgCgTgAgggCATTgA	19	360
RBMEII0847	TCACCTgATgAgACCCAgTTCC	22	
FBMEII0848	gACCCgCATgAggAAgACATC	21	370
FBMEII0848	TCAATCgCgATAgTTCACCgTTgT	23	
FEXOF	CCggTggTTggAAACATCTC	20	373
REXOF	TCACACggCATAggTgAAATCC	22	
FEXOT	CTCggCATTgCggCTATTTTC	19	318
REXOT	TCACAgAACgCCgAAggCCATTT	23	
FOMP 31	ggCggCAAgTTCAAgcATC	21	341
R OMP31	CAggTTgAACgCagACTTg	19	

Tableau V.1 □ Tableau des oligonucléotides forward, reverse et taille attendues des inserts.

- Boschiroli, M.L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Allardet-Servent, A., Cazevielle, C., Lavigne, J.P., Liautard, J.P., Ramuz, M. and O'Callaghan, D. (2002) Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet Microbiol*, **90**, 341-348.
- Briones, G., Inon de Iannino, N., Roset, M., Vigliocco, A., Paulo, P.S. and Ugalde, R.A. (2001) *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect Immun*, **69**, 4528-4535.
- Broceno, C., Walsh, K. and Pons, G. (1999) A 1.3-kb upstream 5' region of the rat phosphoglycerate mutase m gene confers testis and skeletal muscle-specific expression in transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun*, **263**, 244-250.
- Christie, P.J. (2001) Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol Microbiol*, **40**, 294-305.
- Comerci, D.J., Martinez-Lorenzo, M.J., Sieira, R., Gorvel, J.P. and Ugalde, R.A. (2001) Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol*, **3**, 159-168.
- Delrue, R.M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J.P. and Letesson, J.J. (2001) Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol*, **3**, 487-497.
- DelVecchio, V.G., Kapatral, V., Elzer, P., Patra, G. and Mijer, C.V. (2002) The genome of *Brucella melitensis*. *Vet Microbiol*, **90**, 587-592.
- Denoël, P. (1997) Identification et production d'antigènes utilisables pour le diagnostic cellulaire de la *Brucellose*. *Biologie*. FUNDP, Namur, p. 248.
- Dusha, I. (2002) Nitrogen control of bacterial signal production in *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *Indian J Exp Biol*, **40**, 981-988.
- Essenberg, R.C., Seshadri, R., Nelson, K. and Paulsen, I. (2002) Sugar metabolism by *Brucellae*. *Vet Microbiol*, **90**, 249-261.
- Finlay, B.B. and Cossart, P. (1997) Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science*, **276**, 718-725.
- Frayse, N., Couderc, F. and Poinot, V. (2003) Surface polysaccharide involvement in establishing the *rhizobium*-legume symbiosis. *Eur J Biochem*, **270**, 1365-1380.
- Fretin, D. (2003) Etude de gènes apparentés au système flagellaire chez *Brucella* sp. *Biologie*. FUNDP, Namur.
- Gonzalez, J.E., Semino, C.E., Wang, L.X., Castellano-Torres, L.E. and Walker, G.C. (1998) Biosynthetic control of molecular weight in the polymerization of the octasaccharide subunits of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13477-13482.
- Gorvel, J.P. and Moreno, E. (2002) *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol*, **90**, 281-297.
- Guacucano, M. (2000) An RT-PCR artifact in the characterization of bacterial operon. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, **3**.

- Gudkov, A.T. (1997) The L7/L12 ribosomal domain of the ribosome: structural and functional studies. *FEBS Lett*, **407**, 253-256.
- Halling, S.M. (1998) On the presence and organization of open reading frames of the nonmotile pathogen *Brucella abortus* similar to class II, III, and IV flagellar genes and to LcrD virulence superfamily. *Microb Comp Genomics*, **3**, 21-29.
- Kanipes, M.I., Kalb, S.R., Cotter, R.J., Hozbor, D.F., Lagares, A. and Raetz, C.R. (2003) Relaxed sugar donor selectivity of a *Sinorhizobium meliloti* ortholog of the *Rhizobium leguminosarum* mannosyl transferase LpcC. Role of the lipopolysaccharide core in symbiosis of Rhizobiaceae with plants. *J Biol Chem*, **278**, 16365-16371.
- Kim, S. (2003) Isolation and characterization of Mini-Tn5Km2 insertions mutants of *Brucella abortus* deficient in internalization and intracellular growth in HeLa cells. *Infect Immun.*, **71**(6), 3020-3027.
- Kim, S., Watarai, M., Makino, S. and Shirahata, T. (2002) Membrane sorting during swimming internalization of *Brucella* is required for phagosome trafficking decisions. *Microb Pathog*, **33**, 225-237.
- Lopez-Goni, I., Guzman-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Moriyon, I. and Moreno, E. (2002) Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. *Vet Microbiol*, **90**, 329-339.
- M.Fernandez-Prada, C. (2003) Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infection and Immunity*, **74**, 2110-2119.
- Michaux-Charachon, S., Foulongne, V., O'Callaghan, D. and Ramuz, M. (2002a) [*Brucella* at the dawn of the third milenium: genomic organization and pathogenesis]. *Pathol Biol (Paris)*, **50**, 401-412.
- Michaux-Charachon, S., Jumas-Bilak, E., Allardet-Servent, A., Bourg, G., Boschioli, M.L., Ramuz, M. and O'Callaghan, D. (2002b) The *Brucella* genome at the beginning of the post-genomic era. *Vet Microbiol*, **90**, 581-585.
- Moreno, E. and Moriyon, I. (2002) *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 1-3.
- Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M. and Mayer, H. (1990) *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J Bacteriol*, **172**, 3569-3576.
- Olivier, M., Berthon, P., Chastang, J., Cordier, G. and Lantier, F. (2001) Establishment and characterisation of ovine blood monocyte-derived cell lines. *Vet Immunol Immunopathol*, **82**, 139-151.
- Paulsen, I.T., Seshadri, R., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., Read, T.D., Dodson, R.J., Umayam, L., Brinkac, L.M., Beanan, M.J., Daugherty, S.C., Deboy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Nelson, W.C., Ayodeji, B., Kraul, M., Shetty, J., Malek, J., Van Aken, S.E., Riedmuller, S., Tettelin, H., Gill, S.R., White, O., Salzberg, S.L., Hoover, D.L., Lindler, L.E., Halling, S.M., Boyle, S.M. and Fraser, C.M. (2002) The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13148-13153.
- Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., Sanguedolce, V., Mege, J.L. and Gorvel, J.P. (1998) Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect Immun*, **66**, 2387-2392.

- Pizzaro-Cerda. (1998) *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun.*, **66**(12), 5711-5724.
- Porte, F., Naroeni, A., Ouahrani-Bettache, S. and Liautard, J.P. (2003) Role of the *Brucella* suis lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect Immun.*, **71**, 1481-1490.
- Rick, P.D., Barr, K., Sankaran, K., Kajimura, J., Rush, J.S. and Waechter, C.J. (2003) Evidence that the *wzx*E gene of *Escherichia coli* K-12 encodes a protein involved in the transbilayer movement of a trisaccharide-lipid intermediate in the assembly of enterobacterial common antigen. *J Biol Chem.*, **278**, 16534-16542.
- Rittig, M.G., Alvarez-Martinez, M.T., Porte, F., Liautard, J.P. and Rouot, B. (2001) Intracellular survival of *Brucella* spp. in human monocytes involves conventional uptake but special phagosomes. *Infect Immun.*, **69**, 3995-4006.
- Sola-Landa, A. (1998) A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol. Microbiol.*, **29**(1), 125-138.
- Springer (ed.). (2000) *Atlas of immunology*, USA.
- Vizcaino, N., Cloeckert, A., Verger, J., Grayon, M. and Fernandez-Lago, L. (2000) DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microbes Infect.*, **2**, 1089-1100.
- Vizcaino, N., Cloeckert, A., Zygmunt, M.S. and Fernandez-Lago, L. (2001) Characterization of a *Brucella* species 25-kilobase DNA fragment deleted from *Brucella abortus* reveals a large gene cluster related to the synthesis of a polysaccharide. *Infect Immun.*, **69**, 6738-6748.
- Walque, A.-d. (1999) Caractérisation de 3 protéines de la membrane externe de *Brucella abortus*. *Biologie. FUNDP*, Namur, p. 185.
- Yanagi, M. and Yamasato, K. (1993) Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol Lett.*, **107**, 115-120.